

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**L'influence de l'exocytose mastocytaire sur la réponse hémodynamique à la
big-endothéline-1**

Par

LAURENCE VINCENT

Département de pharmacologie et physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *maître ès sciences* (M. Sc.) en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Février, 2020

Membres du jury d'évaluation

Dr Pedro D'Orléans-Juste, Directeur de recherche, Programme de pharmacologie,
Département de Pharmacologie-Physiologie

Dr Michel Grandbois, Évaluateur interne au programme, Programme de pharmacologie,
Département de Pharmacologie-Physiologie

Dr Ahmed Chraïbi, Évaluateur externe au programme, Programme de physiologie,
Département de Pharmacologie-Physiologie

© Laurence Vincent, 2020

*« Le bonheur n'est pas au sommet de la montagne,
mais dans la façon de la gravir. »*

- Confucius

RÉSUMÉ

L'influence de l'exocytose mastocytaire sur la réponse hémodynamique à la big-endothéline-1

Par

Laurence Vincent

Programmes de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *maître ès sciences* (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La protéase mastocytaire de type 4 (mMCP-4), l'isoforme de la chymase humaine chez la souris, est une sérine protéase synthétisée et emmagasinée dans les granules sécrétoires des mastocytes des tissus conjonctifs. Notre laboratoire a précédemment démontré une contribution importante de la mMCP-4 dans la génération d'ET-1 à partir de la big-ET-1 *in vitro* et *in vivo*. Nous avons rapporté que la mMCP-4 pouvait produire l'ET-1 (1-31) à partir de la big-ET-1, et que celle-ci doit subir une hydrolyse par l'endopeptidase neutre pour former l'ET-1, le peptide vasoactif responsable de l'effet presseur. Nous avons également rapporté la répression génique de la mMCP-4 réduisait d'environ 40% la réponse biologique de la big-ET-1, ce qui suggère une contribution dynamique de la mMCP-4 dans la génération d'ET-1.

L'activité enzymatique de la chymase étant exclusivement dépendante de sa sécrétion par les mastocytes, le but principal de cette étude était de montrer l'influence de l'état de stabilité mastocytaire sur la réponse hémodynamique mMCP-4-spécifique de la big-ET-1.

Nous avons utilisé la souris comme modèle expérimental. Dans un premier temps, nous avons évalué l'activité spécifique de la mMCP-4 par des essais fluorogéniques *in vitro* dans les mastocytes suite à l'administration d'agents modulateurs de l'exocytose, le C48/80 et le cromolyn en tant que sécrétagogue et stabilisateur mastocytaires, respectivement. Cette activité enzymatique a été diminuée de manière significative chez les mastocytes en présence de C48/80, démontrant que cet agent induit la déplétion du contenu granulaire en mMCP-4 chez ce type cellulaire. En contraste, le cromolyn a favorisé la stabilisation du contenu granulaire, montrée par une activité hydrolytique supérieure. En deuxième lieu, par une méthode de dosage par spectrométrie de masse, nous avons évalué la production d'un métabolite, l'ET-1 (1-31), issu de l'hydrolyse de la big-ET-1 par la mMCP-4. Nous avons pu observer une augmentation significative de la quantité relative d'ET-1 (1-31) produite par les mastocytes en présence de C48/80 *in vitro*, et une inhibition complète de cette conversion en présence de cromolyn. En dernier lieu, nous avons évalué l'influence de l'exocytose mastocytaire sur la réponse biologique de la big-ET-1 chez la souris anesthésiée. Nous avons rapporté une potentiation de la réponse pressive à la big-ET-1 suivant l'administration d'un dégranulateur mastocytaire, et une diminution de cette réponse suivant l'administration d'un stabilisateur mastocytaire, suggérant une atteinte à la voie métabolique chymase/NEP dans la génération d'ET-1.

En conclusion, notre étude a permis de confirmer une participation importante de l'état de stabilité mastocytaire sur la réponse pressive de la big-ET-1 chez la souris.

Mots clés : mMCP-4, endothéline, mastocyte, C48/80, Cromolyn.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Table des matières.....	v
Liste des communications.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements	xiii
Introduction	1
1 Les mastocytes.....	1
1.1 Préambule.....	1
1.2 Le développement et différenciation des mastocytes.....	1
1.2.1 Précurseurs cellulaires	1
1.2.2 Principaux régulateurs de la différenciation mastocytaire	4
1.2.2.1 Le SCF et son récepteur KIT	4
1.2.2.2 Interleukine-3	6
1.3 Classification des mastocytes.....	6
1.4 Caractéristiques et libération des médiateurs mastocytaires.....	7
1.5 Rôles physiologiques et pathologiques des mastocytes.....	10
2 La dégranulation mastocytaire.....	11
2.1 Activation via les récepteurs membranaires	11
2.1.1 Activation immunologique par les récepteurs FcεRI	12
2.1.2 Activation non-immunologique via les récepteurs MRGPRX2/Mrgprb2	13
2.2 Physiologie des granules mastocytaires	14
2.3 Voies sécrétoires des mastocytes	15
2.3.1 Voie de dégranulation régulée	15
2.3.2 Voie de sécrétion constitutive.....	16
2.4 Modulation pharmacologique de l'exocytose chez les mastocytes	18
2.4.1 Activation des mastocytes par le C48/80	18
2.4.2 Stabilisation des mastocytes par le cromolyn.....	19
3 La chymase	21
3.1 Caractéristiques générales de la chymase.....	21
3.2 Classification des chymases mastocytaires.....	21
3.3 Activation et inhibition physiologique de la chymase	22
3.4 Substrats de la chymase	24
3.5 Inhibiteurs pharmacologiques de la chymase	25
3.6 Rôle de la chymase en conditions physiopathologiques.....	26
4 L'endothéline-1.....	27
4.1 Historique.....	27
4.2 Structure et biosynthèse de l'endothéline-1.....	28
4.2.1 Voie dépendante de l'enzyme de conversion de l'endothéline-1	29

4.2.2	Voie dépendante de la chymase mastocytaire	29
4.3	Les récepteurs de l'endothéline-1	30
4.3.1	Signalisation des récepteurs de l'endothéline-1	30
4.3.2	Effet pharmacologique de l'endothéline-1	32
5	L'angiotensine II	32
5.1	Le système rénine-angiotensine	32
5.2	Structure et biosynthèse de l'angiotensine II	33
5.2.1	Voie dépendante de l'enzyme de conversion de l'angiotensine	33
5.2.2	Voie dépendante de la chymase mastocytaire	33
5.3	Les récepteurs de l'angiotensine II	35
5.3.1	Signalisation des récepteurs de l'angiotensine II	35
5.3.2	Effet pharmacologique de l'angiotensine II	36
	Question principale	37
	But de l'étude	37
	Hypothèse	37
	Objectifs	37
	Matériel et méthodes	38
1	Animaux	38
2	Peptides utilisés	38
3	Méthodologie générale	40
3.1	Vérification du génotypage des souris	40
3.1.1	Extraction d'ADN	40
3.1.2	Amplification de l'ADN par réaction en chaîne de la polymérase	40
3.2	Isolation des mastocytes péritonéaux	41
3.3	Préparation des échantillons tissulaires	42
3.3.1	Prélèvement et homogénéisation des cœurs et poumons	42
3.3.2	Dosage protéique	43
3.4	Mesure de l'activité hydrolytique à l'aide d'un substrat fluorogénique	44
3.4.1	Essais enzymatiques avec mastocytes péritonéaux	44
3.4.2	Essais enzymatiques avec homogénats de tissus	45
3.4.3	Essais enzymatiques avec la chymase recombinante	45
3.5	Mesure de l'activité hydrolytique à l'aide d'un substrat colorimétrique	46
3.6	Étude <i>in vivo</i>	47
3.6.1	Chirurgie	47
3.6.2	Enregistrement et injections	47
3.6.3	Analyse des données	48
3.7	Étude de la production d'ET-1 (1-31) par les mastocytes péritonéaux	48
4	Étude des paramètres hémodynamiques chez la souris anesthésiée ...	49
4.1	Protocoles expérimentaux	49
4.2	Justification des voies d'administration et des doses	49
5	Analyses statistiques	50
6	Éthique animale	50

Résultats	51
1	Confirmation du génotypage des souris 51
2	Étude des mastocytes péritonéaux 52
2.1	Isolation et décompte des mastocytes péritonéaux.....52
2.2	Effet du C48/80 et du cromolyn sur la viabilité cellulaire.....52
2.3	Activité enzymatique mMCP-4-dépendante des mastocytes péritonéaux54
2.4	Effet du C48/80 et du cromolyn sur l'activité enzymatique des mastocytes...56
3	Étude de l'activité enzymatique dans les tissus 58
3.1	Effet du C48/80, du cromolyn et du TY-51469 sur l'activité chymotrypsine dans les homogénats de tissus pulmonaires.....58
3.2	Effet du C48/80 et du cromolyn sur l'activité chymotrypsine dans les homogénats de ventricule gauche.....58
4	Étude de spécificité 61
5	Production <i>in vitro</i> d'ET-1 (1-31) par des mastocytes péritonéaux 62
6	Étude des paramètres hémodynamiques chez la souris anesthésiée ... 64
6.1	Étude de la réponse pressive à l'injection de big-ET-1 64
6.1.1	Effets opposés du C48/80 et du cromolyn sur la courbe dose-réponse de la big-ET-1 64
6.1.2	Étude de la réponse pressive à l'injection des produits de métabolisme de la big-ET-1 68
6.1.3	Effets du TY-51469 sur la réponse hémodynamique à la big-ET-1..... 71
6.2	Étude de la réponse pressive à l'injection d'Ang I 73
6.2.1	Courbe dose-réponse à l'Ang I..... 73
6.2.2	Effet du TY-51469 sur la réponse pressive à l'injection d'Ang I 73
6.2.3	Effet du C48/80 et du cromolyn sur la réponse pressive à l'injection d'Ang I..... 75
6.2.4	Étude de la réponse pressive à un analogue ECA-résistant de l'Ang I..... 76
Discussion	78
1	Résumé des résultats et validation de l'hypothèse 78
2	Originalité de la présente étude 79
3	Validation des modèles expérimentaux 80
3.1	Impact de la répression génique de la mMCP-4 au niveau des mastocytes péritonéaux et chez la souris <i>in vivo</i>80
3.2	Analyse de spécificité du C48/80 et du cromolyn.....81
4	Rôle de l'exocytose mastocytaire dans la réponse à la big-ET-1 <i>in vivo</i> 82
4.1	Activation mastocytaire82
4.2	Stabilisation mastocytaire.....84
5	Limites et approches alternatives 87
Conclusion générale	88
Perspectives	88
Liste des références	90

LISTE DES COMMUNICATIONS

Présentations par affiche

Vincent, L., Touil, H., Desbiens, L., Lapointe C. et D'Orléans-Juste, P. Effet opposés de la dégranulation et de la stabilisation mastocytaire sur la réponse hémodynamique à la big-endothéline-1. Journée PHARE, Novembre 2018.

Vincent, L., Lapointe, C., Ly, K., Gagnon, H., Lo, M. et D'Orléans-Juste, P. La dégranulation mastocytaire exacerbe les réponses biologiques dépendantes de la chymase. Congrès DOCC, Mai 2019.

Contribution à des articles de recherche

Desbiens, L., Lapointe, C., Gendron, L., Gharagozloo, M., **Vincent, L.**, Pejler, G., Gris, D. et D'Orléans-Juste, P. (2019) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis potentiates mouse mast cell protease 4-dependent pressor responses to centrally or systemically administered big endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 370(3): 437-46.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Développement des mastocytes et des basophiles à partir de cellules souches hématopoïétiques	3
Figure 2 : Voie de signalisation du récepteur KIT et de son ligand, le facteur de croissance des cellules souches ou SCF, chez les mastocytes.....	5
Figure 3 : Étapes de dégranulation mastocytaire, de production <i>de novo</i> de médiateurs et de réapprovisionnement en granule.....	8
Figure 4 : Principaux récepteurs et ligands impliqués dans l'activation des mastocytes	12
Figure 5 : Voies sécrétoires des mastocytes	17
Figure 6 : Morphologie des granules mastocytaires	18
Figure 7 : Mécanisme d'activation de la chymase par la DPPI en présence d'héparine	23
Figure 8 : Biosynthèse de l'ET-1	28
Figure 9 : Contribution de la chymase et de l'ECA dans la production d'Ang II	34
Figure 10 : Dosage protéique par la méthode de Bradford.....	44
Figure 11 : Amplification des gènes par PCR	51
Figure 12 : Décompte mastocytaire chez les souris WT et mMCP-4 KO.....	53
Figure 13 : Activité enzymatique dans les mastocytes péritonéaux	55
Figure 14 : Activité enzymatique dans les mastocytes péritonéaux prétraités au C48/80 et au cromolyn	57
Figure 15 : Effet du C48/80 et du cromolyn sur l'activité enzymatique dans les tissus pulmonaires en absence ou en présence de TY-51469	59
Figure 16 : Effet du C48/80 et du cromolyn sur l'activité enzymatique dans les tissus ventriculaires gauches.....	60
Figure 17 : Étude de l'interaction possible entre le C48/80, le cromolyn et le TY-51469 et l'activité enzymatique de la rmMCP-4.....	61
Figure 18 : Conversion de la big-ET-1 en ET-1 (1-31) par des mastocytes péritonéaux	63
Figure 19 : Effet du C48/80 et du cromolyn sur les courbes doses-réponses à la big-ET-1.....	65
Figure 20 : Réponse pressive à l'injection de la big-ET-1	66
Figure 21 : Profil hémodynamique à l'injection de la big-ET-1.....	67
Figure 22 : Réponse pressive à l'injection d'ET-1 (1-31)	69
Figure 23 : Réponse pressive à l'injection d'ET-1	70
Figure 24 : Contribution de la chymase dans la réponse pressive à la big-ET-1.....	72
Figure 25 : Courbes doses-réponse à l'Ang I	74
Figure 26 : Effet du C48/80 et du cromolyn sur la réponse pressive à l'Ang I	75
Figure 27 : Réponse pressive à l'injection de [Pro ¹¹ , D-Ala ¹²] Ang I	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des différents sous-types de mastocytes chez la souris et l'humain	7
Tableau 2 : Médiateurs mastocytaires	9
Tableau 3 : Sécrétagogues et activateurs des mastocytes.	20
Tableau 4 : Stabilisateurs et inhibiteurs de la dégranulation des mastocytes	20
Tableau 5 : Caractéristiques des différentes chymases retrouvées dans les mastocytes humains et de souris	22
Tableau 6 : Substrats de la chymase	24
Tableau 7 : Substrats de la mMCP-4	25
Tableau 8 : Espèces chez lesquelles les inhibiteurs de la chymase ont été validés	26
Tableau 9 : Caractéristiques des sous-types de récepteurs de l'endothéline	31
Tableau 10 : Caractéristiques des sous-types de récepteurs de l'angiotensine II	36
Tableau 11 : Liste des composés peptidiques et inhibiteurs	39
Tableau 12 : Caractéristiques des amorces utilisées dans le génotypage des souris	41
Tableau 13 : Produits utilisés et concentrations requises pour la réaction d'amplification..	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Δ PAM	variation de pression artérielle moyenne
Ang I	angiotensine I
Ang II	angiotensine II
AT ₁ R	récepteur à l'Ang II de type 1
AT ₂ R	récepteur à l'Ang II de type 2
AT ₄ R	récepteur à l'Ang II de type 4
big-ET-1	big-endothéline-1
BMCP	<i>bipotent basophil/mastcell progenitors</i>
BSA	albumine sérique bovine
C48/80	composé 48/80
CLHP	chromatographie en phase liquide à haute performance
CMP	<i>common myeloid progenitors</i>
CS-A	chondroïtine-4-sulfate
CS-E	chondroïtine-4,6-sulfate
CTMC	mastocyte des tissus conjonctifs
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DPPI	dipeptidyl peptidase I
DS	dermatan sulphate
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
ED50	dose efficace médiane
ET-1	endothéline-1
ET-1 (1-31)	endothéline-1 (1-31)
ET-2	endothéline-2
ET-3	endothéline-3
Fc ϵ RI	récepteur du fragment Fc de la chaîne ϵ des IgE
FDA	<i>food and drug administration</i>
FGF-2	récepteur 2 des facteurs de croissance
GMP	<i>granulocyte/monocyte progenitors</i>
GRB2	<i>growth-factor-receptor-bound protein 2</i>
IgE	immunoglobuline de type E
IL	interleukine
IP3	inositol 1,4,5-triphosphate
ITAM	récepteur immunitaire basé sur la tyrosine
JAK-STAT	<i>janus kinase-signal transducer and activator of transcription</i>
KCl	chlorure de potassium
K_d	constante de dissociation
KO	<i>knock out</i>
LDL	lipoprotéine de basse densité
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP	<i>mast cell progenitors</i>
MC _T	mastocyte tryptase

MC _{TC}	mastocyte tryptase-chymase
MEP	<i>megakaryocyte/erythrocyte progenitors</i>
MES	acide 2-(N-morpholino) éthanosulfonique
MMC	mastocyte des tissus muqueux
mMCP	protéase mastocytaire
mMCP-4 KO	souris déficiente pour la protéase mastocytaire murine de type 4
MMP-9	métalloprotéinase matricielle 9
Mrgprb2	<i>mas-related G protein coupled receptor b2</i>
NaCl	chlorure de sodium
NEM	N-ethylmaleimide
NEP	néprilysine
NO	oxyde nitrique
PAM	pression artérielle moyenne
pbs	paire de base
PBS	tampon phosphate saline
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PLC γ	phospholipase C γ
préproET-1	préproendothéline-1
p-value	valeur de probabilité
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RE	réticulum endoplasmique
rmMCP-4	mMCP-4 recombinante
SCF	facteur de cellules souches
SEM	erreur standard sur la moyenne
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors</i>
SPE	extraction en phase solide
SRA	système rénine-angiotensine
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
TGF- β 1	facteur de croissance tumorale
TNF- α	facteur de nécrose tumorale
UST	unité de souris transgénique
VAMP	<i>vesicle associated membrane proteins</i>
WT	souris de type sauvage

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Pr Pedro D'Orléans-Juste, de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire. Son esprit scientifique, rigoureux et novateur complète généreusement ses qualités humaines exceptionnelles, son altruisme, son empathie et son sens de l'humour. Merci Pedro, ce fut pour moi l'expérience la plus stimulante que j'ai pu connaître à ce jour.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire : Catherine Lapointe pour ta présence rayonnante au laboratoire, Hanène Touil pour ta gentillesse et ton amitié, Louisane Desbiens pour ton savoir-faire incroyable et Martin Houde pour tes connaissances illimitées, avec qui j'ai souvent eu des discussions très enrichissantes. Je vous remercie d'avoir contribué à la belle atmosphère du laboratoire.

J'aimerais remercier ma précieuse amie, Elsa, pour nos innombrables discussions scientifiques toujours très intéressantes et qui a su, malgré la distance, m'offrir son support et son écoute tout au long de mes études.

Je désire également remercier mes sœurs, Marie-Caroline et Louise pour leur soutien tout au long de mon parcours. Un grand merci à mes parents Monique et Léonard pour votre écoute, votre appui et votre support qui ont été essentiels à mon bien-être et à ma réussite. Merci de me faire confiance, de m'encourager et surtout de m'avoir grandement aidé, émotionnellement et financièrement, à poursuivre mes études graduées.

Finalement, je remercie les Pr Michel Grandbois, Ahmed Chraïbi et Pedro d'Orléans-Juste d'avoir accepté de corriger ce mémoire.

INTRODUCTION

1 LES MASTOCYTES

1.1 Préambule

Les mastocytes ont été décrits pour la première fois par le Dr Paul Ehrlich dans sa thèse de doctorat en 1878 (Ehrlich, 1878). La coloration cellulaire à l'aide d'un colorant basique comme le bleu de toluidine lui a permis d'observer que ces cellules tissulaires possédaient des granules cytoplasmiques de taille importante en grand nombre. Il les baptisa *Mastzellen*, pour « cellules bien nourries », persuadé qu'elles avaient une fonction nutritionnelle. Il fut également le premier à décrire le phénomène de dégranulation mastocytaire. Ce n'est qu'en 1953 que fut établi le rôle des mastocytes dans les réactions d'hypersensibilité immédiate. Riley et West ont montré que les mastocytes contenaient de l'histamine et pouvaient libérer, lors d'une stimulation, ce médiateur reconnu comme étant responsable du choc anaphylactique (Mota, 1994; Riley et West, 1953). Par la suite, de nombreuses études ont permis de mettre en lumière les rôles physiologiques et immunologiques de la dégranulation mastocytaire et de la libération de médiateurs dans l'environnement extracellulaire.

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons à l'impact de l'activation et de l'inhibition pharmacologique des mastocytes sur la génération d'endothéline-1 (ET-1), un puissant vasoconstricteur des vaisseaux sanguins, par une enzyme exclusivement présente au niveau des granules mastocytaires, la protéase mastocytaire de type 4 (mMCP-4), qui sera discutée plus en détail dans une section dédiée.

1.2 Le développement et différenciation des mastocytes

1.2.1 Précurseurs cellulaires

Les mastocytes se développent à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes présentes dans la moelle osseuse. Ces cellules expriment les marqueurs de surface CD34+ et CD117 ou c-Kit, récepteur du facteur de cellules souches (*stem cell factor*,

ou SCF). Ces marqueurs peuvent influencer la différenciation des mastocytes en fonction de leur localisation tissulaire, sous l'action de cytokines environnantes. Les mastocytes proviennent des progéniteurs communs myéloïdes (*common myeloid progenitors*, ou CMP) qui sont également à l'origine d'autres lignages hématopoïétiques (Kondo *et al.*, 1997). Ces derniers peuvent ensuite se différencier en progéniteurs des mégacaryocytes et des érythrocytes (*megakaryocyte/erythrocyte progenitors*, ou MEP), en progéniteurs des monocytes et des granulocytes (*granulocyte/monocyte progenitors*, ou GMP) ou directement en progéniteurs des mastocytes (*mast cell progenitors*, ou MCP). Contrairement à de nombreuses cellules hématopoïétiques libérées dans la circulation systémique sous forme mature et fonctionnelle, les progéniteurs des mastocytes migrent à partir de la moelle osseuse vers la périphérie en tant que cellules indifférenciées par des mécanismes encore mal définis. Ces progéniteurs migrent ensuite dans les tissus où ils peuvent donner naissance aux deux sous-groupes majeurs des mastocytes, les mastocytes des tissus muqueux (*mucosal mast cell*, ou MMC) et les mastocytes des tissus conjonctifs (*connective tissue mast cell*, ou CTMC), qui seront discutés plus en détail dans la section suivante (Figure 1) (Akashi *et al.*, 2000). Récemment, Arinobu *et al.* (2005) et Qi *et al.* (2013) ont identifié des progéniteurs bipotents des basophiles et des mastocytes (*bipotent basophil/mast cell progenitors*, ou BMCP) dans la rate de souris, suggérant une relation de développement étroitement liée entre la lignée des basophiles et des mastocytes.

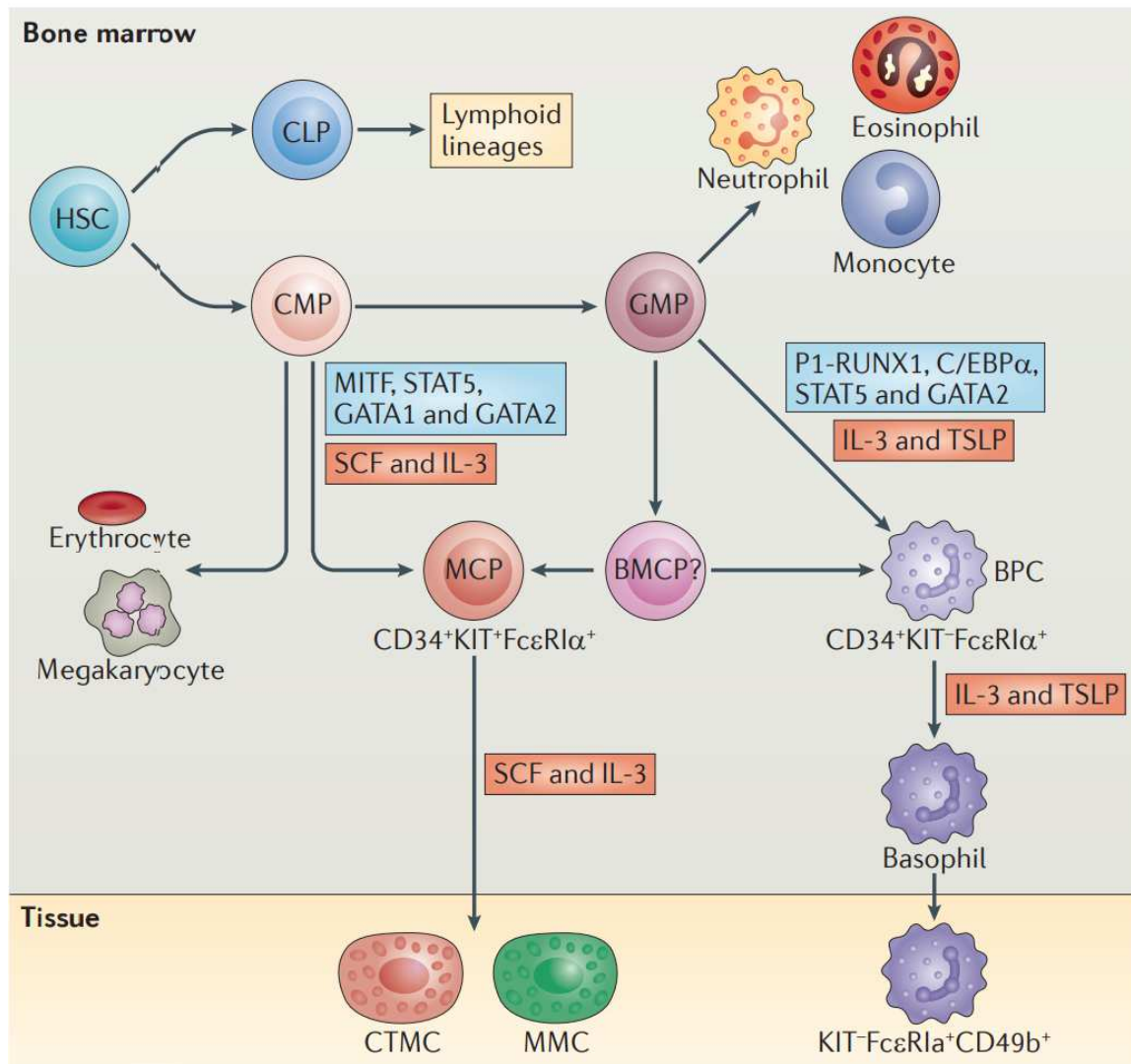


Figure 1 : Développement des mastocytes et des basophiles à partir de cellules souches hématopoïétiques.

[Figure 2 de (Voehringer, 2013) reproduite avec la permission]

1.2.2 Principaux régulateurs de la différenciation mastocytaire

Les mastocytes mûrissent au niveau des microenvironnements tissulaires conjonctifs ou muqueux sous l'influence de différents facteurs de croissance spécifiques (Metcalf *et al.*, 1995). Ces derniers incluent le SCF, le ligand du récepteur de la tyrosine kinase c-kit et l'interleukine (IL)-3. D'autres médiateurs tels que IL-4, IL-9 et IL-10 peuvent également jouer un rôle important dans le développement et la maturation mastocytaire (Galli, 2000). Le phénotype des mastocytes peut être modifié suivant leur localisation. En effet, les travaux de Nakano *et al.* (1985) ont montré que les mastocytes injectés dans un nouveau microenvironnement tissulaire peuvent acquérir les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des mastocytes résidents.

1.2.2.1 Le SCF et son récepteur KIT

Le SCF, aussi connu sous le nom du ligand KIT, est un facteur de croissance qui existe à la fois sous forme soluble et sous forme liée à la membrane. Ce facteur de croissance est exprimé par les cellules fibroblastes et les cellules épithéliales (Lennartsson et Rönnstrand, 2012). Sous forme de dimère, le SCF active le récepteur de tyrosine kinase c-kit, aussi appelé KIT. La dimérisation de KIT induit une autophosphorylation des résidus de tyrosines de la queue cytoplasmique, ce qui entraîne par la suite le recrutement de diverses molécules adaptatrices telles que la phospholipase C γ (PLC γ), les kinases de la famille de SRC, le GRB2 ou la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) permettant l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT et des MAPK. Ces voies de signalisation favorisent la prolifération, la migration, la survie et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques (Figure 2) (Gilfillan et Tkaczyk, 2006). Chez l'humain, une mutation dans le gène du récepteur KIT peut provoquer la dérégulation de cette voie de signalisation entraînant une trop forte activation du récepteur, provoquant le phénomène pathologique de mastocytose systémique. Chez ces patients, la mutation *D816V* (substitution d'un résidu d'acide aspartique pour un résidu de valine) dans le domaine catalytique est la plus fréquente et entraîne une autophosphorylation constitutive du récepteur KIT, indépendamment du SCF. Cette pathologie entraîne une accumulation des mastocytes dans certains organes et un relargage constitutif de médiateurs mastocytaires au niveau local (Chatterjee *et al.*, 2015).

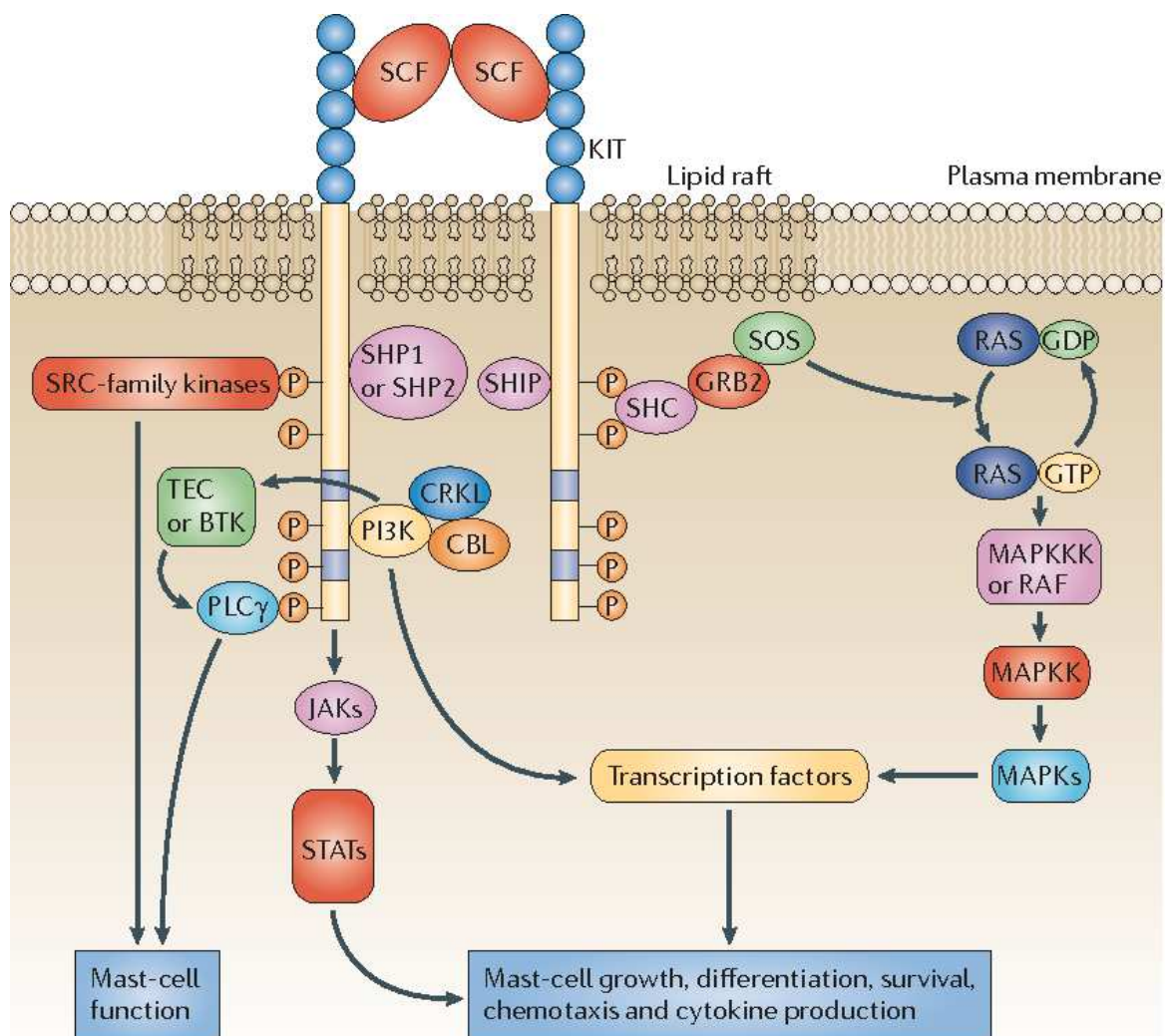


Figure 2 : Voie de signalisation du récepteur KIT et de son ligand, le facteur de croissance des cellules souches ou SCF, chez les mastocytes.

[Figure 5 de (Gilfillan et Tkaczyk, 2006) reproduite avec la permission]

1.2.2.2 Interleukine-3

L'IL-3 est une cytokine produite par plusieurs types cellulaires tels que les fibroblastes et les lymphocytes T. Lorsqu'elle est associée au SCF, elle stimule la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, le développement et la maturation des mastocytes. Toutefois, elle ne semble pas indispensable à la génération des mastocytes puisque les souris dépourvues du gène de l'IL-3 (IL-3^{-/-}) ne démontrent pas d'anomalies phénotypiques, à l'exception d'un nombre réduit de mastocytes. Lantz *et al.* (1998) ont montré que l'IL-3 n'était pas essentielle à la génération des mastocytes en conditions physiologiques, mais contribuerait à l'augmentation du nombre de mastocytes tissulaires chez la souris en conditions pathologiques. Leurs travaux indiquent que l'IL-3 et le SCF joueraient un rôle synergique dans l'immunité et la prolifération des mastocytes.

1.3 Classification des mastocytes

On distingue deux sous-types majoritaires de mastocytes basés sur le contenu en protéases granulaires, soit les mastocytes des tissus muqueux ou MMC, qui contiennent la tryptase, et les mastocytes des tissus conjonctifs ou CTMC, qui contiennent la tryptase, la chymase et la carboxypeptidase A. Les MMC sont principalement localisés au niveau de la muqueuse du système gastro-intestinal et dans la *lamina propria* des voies respiratoires (Metcalf *et al.*, 1997). Les CTMC sont localisés dans la sous-muqueuse de l'appareil gastro-intestinal, dans la peau, dans le péritoine et à proximité des vaisseaux sanguins (Aldenberg et Enerbäck, 1985). D'un point de vue phénotypique, les deux sous-types se distinguent par leur taille, leur teneur en histamine, la nature du protéoglycane formant les granules de sécrétion et leur contenu en protéases. L'héparine est retrouvée exclusivement dans les CTMC, tandis que les MMC produisent la chondroïtine-4-sulfate (CS-A), la chondroïtine-4,6-sulfate (CS-E) et le dermatan sulfate (DS) (Mulloy *et al.*, 2017). D'un point de vue fonctionnel, il est intéressant de noter que les MMC sont peu sensibles au cromolyn, un agent stabilisateur de mastocyte utilisé pour prévenir la dégranulation, ou au composé 48/80 (C48/80), un inducteur de la dégranulation. Au contraire, les CTMC sont stabilisés par le cromolyn et dégranulent en réponse au C48/80 (Pearce *et al.*, 1982).

Ces deux sous-types sont aussi séparés chez l'homme en fonction de leur contenu en protéases et de leur localisation, soit les mastocytes tryptase-chymase (MC_{TC}) et les mastocytes tryptase (MC_T), homologues aux CTMC et aux MMC, respectivement. Les principales différences phénotypiques entre les sous-types de mastocytes chez l'humain et la souris sont représentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des différents sous-types de mastocytes chez la souris et l'humain. [Reproduit intégralement à partir (Bradding et Arthur, 2016)]

Caractéristiques	Mastocytes de souris		Mastocytes humains	
	MMC	CTMC	MCT	MCTC
Contenu en protéase	Chymase	Chymase	Tryptase	Tryptase, chymase, carboxypeptidase, cathepsine G
Type de protéoglycanes	Chondroïtine sulfatée	Héparine	Héparine	Héparine
Localisation	Tissus mucosaux	Tissus conjonctifs ou séreux	Épithélium, <i>lamina propria</i>	<i>Lamina propria</i> , tissus conjonctifs, peau
Marquage en immunohistochimie	Bleu alcian +	Safranine +	Safranine +	Safranine +
Relargage LTC ₄	+++	-	+++	+
Relargage PGD ₂	+	+	+++	+++
Activation par le FcεRI	Oui	Oui	Oui	Oui
Activation par la substance P	Non	Oui	Non	Oui
Réponse aux C5a	Oui	Oui	Non	Oui
Inhibé par le cromolyn	Non	Oui	Oui (faible)	Non

Abréviations : CTMC, mastocytes des tissus conjonctifs ; FcεRI, récepteur du fragment Fc de la chaîne ε des IgE ; LTC₄, leucotriène C4 ; MCT, mastocytes positifs pour la tryptase ; MCTC, mastocytes positifs pour la tryptase et la chymase ; MMC, mastocytes des tissus muqueux ; PGD₂, prostaglandine D2.

1.4 Caractéristiques et libération des médiateurs mastocytaires

Les mastocytes sont mieux connus pour la production d'histamine associée aux réactions allergiques et à une vasodilatation lors de leur activation. Toutefois, les mastocytes synthétisent une multitude de facteurs de croissance, de protéases, de cytokines, de chimiokines et de métabolites d'acides gras (Blank et Vitte, 2015).

La libération des médiateurs par les mastocytes se produit en 3 vagues distinctes (Figure 3). Lors de l'activation, la réaction de dégranulation des mastocytes induit d'abord le relargage des médiateurs préformés dans les granules, responsables des effets aigus de

l'activation des mastocytes. Une seconde vague survient dans les 15 à 30 minutes suivant la stimulation et engage la libération de médiateurs lipidiques nouvellement synthétisés dérivés des phospholipides membranaires. Finalement, une troisième vague survient dans l'heure suivant la stimulation, impliquant la synthèse *de novo* de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance par induction de la transcription et de la traduction (Abraham et St. John, 2010; Blank, 2011; Wang *et al.*, 2011). Il est intéressant de noter que les mastocytes peuvent participer à plusieurs épisodes de dégranulation et nécessitent un temps de régénération des granules d'environ 72 heures (Blank, 2011). Le Tableau 2 présente les différents médiateurs dits préformés et nouvellement synthétisés, ainsi que leurs caractéristiques physiopathologiques correspondantes.

Il est possible que certains stimuli favorisent la production de médiateurs en absence d'une réponse de dégranulation. Toutefois, les mécanismes de libération dans l'espace extracellulaire sont encore peu définis dans la littérature à ce jour (Stow *et al.*, 2009; Lorentz *et al.*, 2012). Les mécanismes d'exocytose par les mastocytes seront discutés dans une prochaine section.

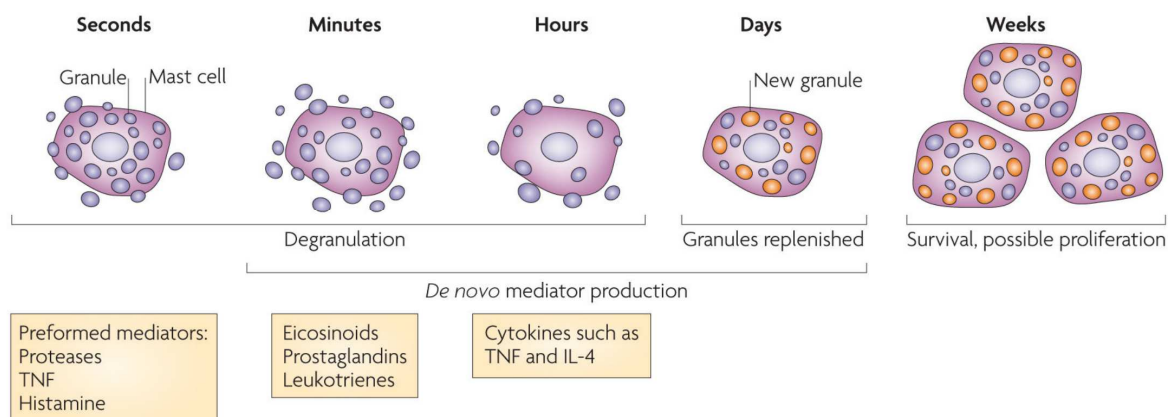


Figure 3 : Étapes de dégranulation mastocytaire, de production *de novo* de médiateurs et de réapprovisionnement en granule.

[Figure 3 de (Abraham et St. John, 2010) reproduite avec la permission]

Tableau 2 : Médiateurs mastocytaires. [Modifié de (Theoharides *et al.*, 2007) et (Blank et Vitte, 2015)]

Synthèse	Catégorie biochimique	Exemples	Rôle physiopathologique
Préformés	Amines biogènes	Histamine	Vasodilatation, angiogenèse, augmentation de la perméabilité vasculaire, bronchoconstriction
		Sérotonine	Vasoconstriction, nociception
	Chimiokines	IL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-4	Chimio attraction, infiltration tissulaire des leucocytes
	Enzyme	Tryptase	Sérine-protéases spécifiques du mastocyte, fortement basique, aux multiples effets : dégradation de la matrice extracellulaire, effets pro-inflammatoires, nociception
		Chymase	
		Carboxypeptidase A	Sérine protéase cytotoxique inductrice d'apoptose
		Granzyme B	
		Cathepsines C,D,E	Protéases pléiomorphes : pro inflammatoire, pro-apoptotique, activatrice des sérines-protéases
		Métalloprotéinases	Dégradation de la matrice extracellulaire
		Kininogénases	Conversion des kininogènes en kinines
		Peroxydases	Détoxification de formes réactives de l'oxygène ; effet anti bactérien
		Phospholipases	Production de dérivés des phospholipides
		Procaspases	Effet pro-apoptotique
	Médiateurs peptidiques	Arylsulfatases	Hydrolyse des lipides et protéoglycanes
		NO synthase	Production d'oxyde nitreux
		Bradykinines	Vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, bronchoconstriction, nociception, activation mastocytaire
		Somatostatine	Effets sur le système nerveux central, l'appareil digestif, le système endocrinien
	Protéoglycanes	Substance P	Vasodilatation, nociception, activation mastocytaire
		VEGF	Angiogenèse, réparation tissulaire
		Héparine	Stabilisateur des tétramères de tryptase ; possible rôle antibactérien
		Acide hyaluronique	Non dégradé : composant de la matrice cellulaire support de migration cellulaire
	Synthèse de novo	Chondroïtine sulfate	Dégradé : interaction avec des récepteurs toll-like et effet pro-inflammatoire
		IL-1, -3, -4, -5, -6, -9, -10, -13, -16	Composant de la matrice cellulaire ; association aux protéines dans des structures complexes
		IL-1, -3, -4, -5, -6, -9, -10, -13, -16	Pro-inflammatoire, migration cellulaire, nociception
		INF- γ , MIF, TNF- α	Pro-inflammatoire, prolifération cellulaire et activation des cellules Th2
		SCF, GM-CSF, GnRH-1, bFGF, NGF, VEGF	Prolifération des cellules mastocytes
		LTB ₄	Chimio attraction des leucocytes
		LTC ₄	Vasoconstriction, nociception
		PAF	Activation plaquettaire, vasodilatation, pro-inflammatoire
		PGD ₂	Bronchoconstriction, nociception
		NO	Vasodilatation, neuromodulation

Abréviations : bFGF, facteur de croissance des fibroblastes ; GM-CSF, facteur stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages ; GnRH-1, hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires ; IL, interleukine ; INF- γ , interféron gamma ; LTB₄, leucotriène B₄ ; LTC₄, leucotriène C₄ ; MCP, protéine chemoattractante ; MIF, facteur d'inhibition de la migration des macrophages ; NGF, facteur de croissance neuronal ; NO, oxyde nitrique ; PAF, facteur d'activation plaquettaire ; PGD₂, prostaglandine D₂ ; SCF, facteur de cellules souches ; TNF- α , facteur de nécrose tumorale ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.

1.5 Rôles physiologiques et pathologiques des mastocytes

Les mastocytes sont localisés dans tout l'organisme, plus particulièrement au niveau des muqueuses et des tissus conjonctifs à l'interface entre l'hôte et l'environnement. Cette localisation stratégique permet aux mastocytes d'être une des premières lignes de défense de l'organisme contre les pathogènes en plus de posséder la capacité de communiquer avec différents types cellulaires en fonction de la nature des médiateurs inflammatoires libérés (Abraham et St. John, 2010). Les mastocytes ont longtemps été considérés comme les cellules effectrices de l'allergie. En revanche, dans les dernières années, plusieurs études ont permis d'associer le mastocyte à de nombreux processus immunitaires allant de l'initiation de la réponse immunitaire contre les pathogènes jusqu'à la résolution de l'inflammation (Galli et Tsai, 2010). Par ailleurs, des rôles non-immunitaires ont également été décrits, tel que l'interaction avec les neurones dans des phénomènes de nociception et l'interaction avec les cellules endothéliales et musculaires lisses au niveau des vaisseaux sanguins (Abraham et St. John, 2010). De plus, les mastocytes jouent un rôle dans la cicatrisation, le remodelage tissulaire et les maladies auto-immunes (Krishnaswamy *et al.*, 2001; Rao et Brown, 2008). Des études démontrent aussi une contribution des mastocytes dans les pathologies cardiovasculaires et le remodelage ventriculaire (Levick *et al.*, 2011). Les mastocytes semblent participer au développement de l'athérosclérose, de l'inflammation coronaire et de l'ischémie cardiaque (Metzler et Xu, 1997). De plus, en conditions physiologiques, le nombre de mastocytes reste constant, tandis qu'en situations pathologiques, le nombre de mastocytes augmente considérablement en raison d'un recrutement accru au site de l'inflammation (Stone *et al.*, 2010). Cette migration du sang vers les tissus par les mastocytes est médiée par la libération de cytokines, dont le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et l'IL-4, capable de moduler l'adhésion intercellulaire (Amin, 2012). En effet, des études effectuées dans des modèles murins d'infarctus du myocarde démontrent une accumulation massive de mastocytes dans la région infarctée du cœur (Engels *et al.*, 1995; Houde *et al.*, 2018).

2 LA DÉGRANULATION MASTOCYTAIRE

La plus grande particularité morphologique du mastocyte est qu'il possède un contenu granulaire extrêmement riche qui, après une stimulation appropriée, libère un large spectre de médiateurs inflammatoires. La relâche de certains médiateurs varie en fonction de la nature du stimulus. Ces médiateurs sont isolés du cytoplasme et sont renfermés à l'intérieur des granules de sécrétion. Lorsque les mastocytes reçoivent un signal capable d'activer les mécanismes de signalisation cellulaire conduisant à l'augmentation du calcium intracellulaire et à la mobilisation des granules, ils sont en mesure de libérer le contenu granulaire dans le milieu extracellulaire de manière rapide et massive, permettant un effet biologique maximal. Cette section décrit les mécanismes d'activation des mastocytes, les voies de sécrétion ainsi que les propriétés pharmacologiques associées à ce phénomène.

2.1 Activation via les récepteurs membranaires

Les mastocytes constituent une population de cellules hétérogènes particulièrement sensibles aux différents microenvironnements tissulaires au cours du développement et de la maturation. La localisation tissulaire des mastocytes mène à une expression distincte dans les protéases synthétisées et dans l'expression des récepteurs membranaires (Xing *et al.*, 2011; Dwyer *et al.*, 2016). De plus, tel que mentionné plus tôt, le phénotype des mastocytes est hautement modulable en fonction des stimuli inflammatoires, des facteurs de croissance, des cytokines et des métabolites environnementaux (Kitamura, 1989). Dans la Figure 4, on observe différents récepteurs membranaires participant à l'activation des mastocytes. La stimulation peut être déclenchée par la liaison des anticorps spécifiques de l'antigène avec les récepteurs correspondants, appelée activation immunologique. La stimulation induite par des substances telles que des neuropeptides, des cytokines ou des composés sécrétagogues est appelée activation non-immunologique. L'une ou l'autre de ces stimulations permettent ensuite la dégranulation mastocytaire. Par contre, celle-ci est engendrée via des mécanismes biologiques différents (Rosengard *et al.*, 1986).

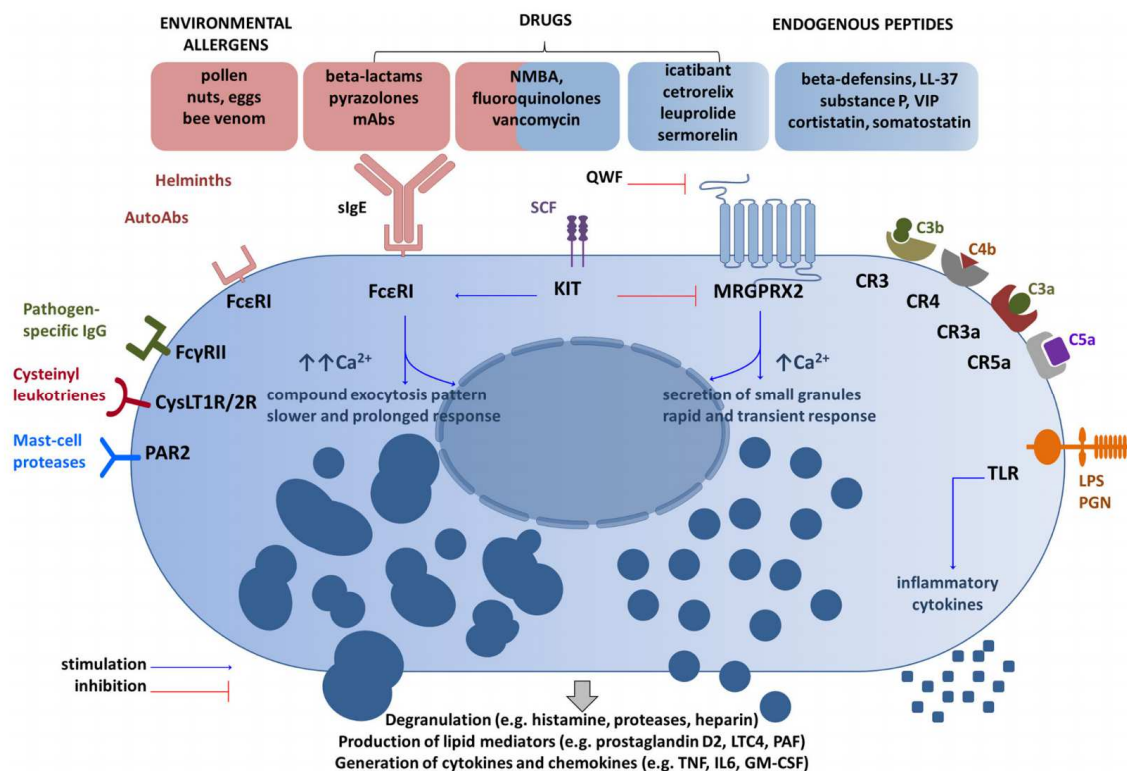


Figure 4 : Principaux récepteurs et ligands impliqués dans l'activation des mastocytes.

[Figure 1 de (Porebski *et al.*, 2018) provenant d'une source « open access » ne nécessitant pas de permission particulière pour la reproduction]

2.1.1 Activation immunologique par les récepteurs *FcεRI*

L'activation classique d'un mastocyte lors d'une réaction inflammatoire se produit par l'intermédiaire du récepteur du fragment Fc de la chaîne ϵ des IgE (*FcεRI*). Ce type de récepteur possède une forte affinité aux immunoglobulines de type E (IgE). La reconnaissance de l'antigène par les IgE liées à leur récepteur *FcεRI* entraîne l'agrégation des récepteurs et l'initiation de la cascade de signalisation permettant la dégranulation et le relargage de médiateurs par les mastocytes. Le récepteur *FcεRI* est un complexe tétramérique composé de trois sous-unités ($\alpha\beta\gamma_2$). La sous-unité α contient le site de fixation aux IgE. Les sous-unités β et γ , contenant les motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*, ou ITAM) interviennent dans la transduction des signaux (Kraft et Kinet, 2007; Wernersson et Pejler, 2014). La

dégranulation des mastocytes peut également être déclenchée par l'agrégation des récepteurs pouvant reconnaître les IgG (FcγRII et FcγRIII) exprimés à la surface. Ces récepteurs peuvent fixer les IgE, mais avec une faible affinité.

L'activation immunologique des mastocytes via les récepteurs FcεRI ou FcγRI déclenche la phosphorylation des ITAM des sous-unités β et γ par la tyrosine kinase LYN. Ce processus permet l'activation d'autres tyrosines kinases telles que FYN et SYK, essentielles pour la phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation de la dégranulation des mastocytes. Le mécanisme se poursuit par l'induction d'une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire par le réticulum endoplasmique (RE) et par un afflux de calcium extracellulaire. En effet, l'activation de la voie de signalisation en aval de FcεRI ou FcγRI favorise la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), qui induit également la libération de calcium du RE à la suite de l'interaction avec son récepteur. Cet influx de calcium active le capteur STIM1 (*Stromal interaction molecule 1*), qui interagit avec Orai1 à la surface de la membrane plasmique pour former des canaux d'entrée de calcium à partir de l'environnement extracellulaire. Les mécanismes contrôlant la fusion des granules et leur exocytose *via* la membrane plasmique sont complexes et restent encore mal caractérisés à ce jour (Azouz *et al.*, 2014). Cet influx de calcium permet la fusion membranaire sous le contrôle de protéines de la famille des SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors*) et des VAMP (*vesicle associated membrane proteins*). Collectivement, ces événements conduisent à la dégranulation massive des mastocytes et à la synthèse et la sécrétion de nouveaux médiateurs (Rivera *et al.*, 2008).

2.1.2 Activation non-immunologique via les récepteurs MRGPRX2/Mrgprb2

L'activation des mastocytes peut se produire indépendamment de l'immunité acquise, soit par l'activation du récepteur Mrgprb2 (*Mas-related G protein coupled receptor b2*) chez la souris, orthologue du récepteur MRGPRX2 chez l'humain. Ce récepteur, faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), est capable de lier la substance P ou le C48/80, mais aussi d'autres sécrétagogues tels que des médiateurs inflammatoires ou des agents associés à des réactions allergiques, ce qui en fait

une cible idéale dans l'inflammation associée à certains traitements thérapeutiques (McNeil *et al.*, 2015).

L'activation non-immunologique des mastocytes via le récepteur Mrgprb2 induit un influx de calcium intracellulaire relativement bref, suivi de l'adressage rapide à la membrane plasmique de granules sphériques de petite taille et au relargage rapide dans le milieu extracellulaire. En contraste avec l'activation immunologique, les granules sécrétoires ne fusionnent pas dans le cytoplasme avant d'être relâchées dans l'environnement extracellulaire (Gaudenzio, 2018).

2.2 Physiologie des granules mastocytaires

Les mastocytes peuvent contenir jusqu'à 1000 granules sécrétoires, occupant près de 40% du volume cellulaire. Programmés pour libérer dans le milieu extracellulaire de manière rapide et massive, les mastocytes peuvent sécréter presque 100% de leur contenu en médiateurs préformés dans un seul évènement de stimulation, comme dans le cas du choc anaphylactique (Blank, 2011). Tandis que toutes les cellules eucaryotes sont capables de transporter et d'exocytoser les protéines par une voie de sécrétion constitutive, certaines cellules, dont les mastocytes, sont en mesure de sécréter leur contenu cytoplasmique de manière régulée.

Dans la Figure 5, on peut observer plusieurs types de granules distincts. Les travaux de Raposo *et al.* (1997) ont permis de mettre en évidence, à l'aide de la microscopie électronique, la présence de 3 types de granules (type I, II et III) morphologiquement distincts dans le cytoplasme des mastocytes (Figure 6). Les granules de type I proviennent de la voie lysosomale/endosomale. Les granules de type II contiennent un noyau protéique dense entouré d'une grande quantité de corps vésiculaires en périphérie et sont formés par la fusion des granules de sécrétion de type I avec des granules de sécrétion immatures provenant du réseau trans-Golgien. Les granules de type III correspondent au stade final de maturité granulaire (Raposo *et al.*, 1997; Blank *et al.*, 2014). Ces granules sont ensuite soumises à de nouvelles modifications puis à l'accumulation de protéases mastocytaires. L'exocytose peut ensuite se produire constitutivement ou selon un mécanisme de sécrétion régulée (Atiakshin *et al.*, 2019).

2.3 Voies sécrétoires des mastocytes

2.3.1 Voie de dégranulation régulée

La voie de sécrétion régulée des mastocytes est déclenchée par l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Cette exocytose peut s'effectuer de différentes manières (Figure 5) (Atiakshin *et al.*, 2019; Klein et Sagi-Eisenberg, 2019):

- Par exocytose classique;
- Par exocytose multiple;
- Par dégranulation fragmentaire;
- Par exocytose selon un mécanisme de *Kiss-and-Run*;
- Par dégranulation anaphylactique;
- Par sécrétion de granules individuelles.

La libération par exocytose classique implique la fusion d'une seule granule de sécrétion avec la membrane plasmique suivie d'une libération du contenu granulaire en entier. La libération par exocytose multiple permet préalablement la fusion de plusieurs granules à l'intérieur du cytoplasme formant une seule granule, entraînant une décharge plus puissante dans le milieu extracellulaire (Klein et Sagi-Eisenberg, 2019). La voie de dégranulation fragmentaire (ou *piecemeal exocytosis*) permet une sécrétion sélective dont l'intensité dépend des conditions du microenvironnement tissulaire. Cette voie de sécrétion implique d'abord une compartimentalisation des granules, puis des vésicules intermédiaires possédant un contenu protéique spécifique se détachent progressivement de la granule. Ces vésicules se déplacent plus rapidement à l'intérieur de la cellule et permettent un transport rapide et différentiel des médiateurs jusqu'à la membrane plasmique pour leur sécrétion (Dvorak, 2005). L'exocytose selon un mécanisme de *Kiss-and-Run* a été proposé dans les années 1970 comme étant un mode d'exocytose alternatif où les vésicules sécrétoires ne sont pas complètement fusionnées, mais seulement en contact avec le plasmalemm (Ceccarelli *et al.*, 1972). Ce contact forme un pore de fusion transitoire permettant la sécrétion de petites quantités de médiateurs sans échange de lipides ou de protéines entre la granule sécrétoire et la membrane plasmique. Cette voie permet également de limiter la grosseur et la quantité des médiateurs libérés (Blank *et al.*, 2014). La dégranulation anaphylactique a lieu suite à une activation immunologique dans une situation de réaction

allergique. Cette sécrétion provoque la libération massive de médiateurs inflammatoires et de protéases (Blank *et al.*, 2014). Il peut également y avoir la formation de macro-vésicules, produites par une invagination de la membrane plasmique. Il est intéressant de noter que cette structure post-cellulaire dépourvue de noyau peut être localisée dans la région extracellulaire pendant un certain temps, représentant une réserve tissulaire de protéases, tel que la chymase, l'enzyme principalement étudiée dans le cadre de l'étude présentée dans ce mémoire (Atiakshin *et al.*, 2019).

2.3.2 Voie de sécrétion constitutive

Les mécanismes menant à l'exocytose constitutive des mastocytes sont encore très peu détaillés dans la littérature à ce jour. Cette voie de sécrétion a lieu en absence de stimulus. Contrairement à la dégranulation régulée des mastocytes, la voie de sécrétion constitutive n'est pas contrôlée par la modulation de la concentration de calcium intracellulaire (Rosengard *et al.*, 1986). Les médiateurs sont d'abord synthétisés sous forme de précurseurs solubles ou transmembranaires dans le RE, puis acheminés dans des vésicules jusqu'au complexe de Golgi pour d'autres modifications post-traductionnelles. Ils sont ensuite chargés dans des petites vésicules de transport ou des endosomes de recyclage qui seront acheminés directement à la surface de la cellule pour une sécrétion constitutive (Lacy et Stow, 2011).

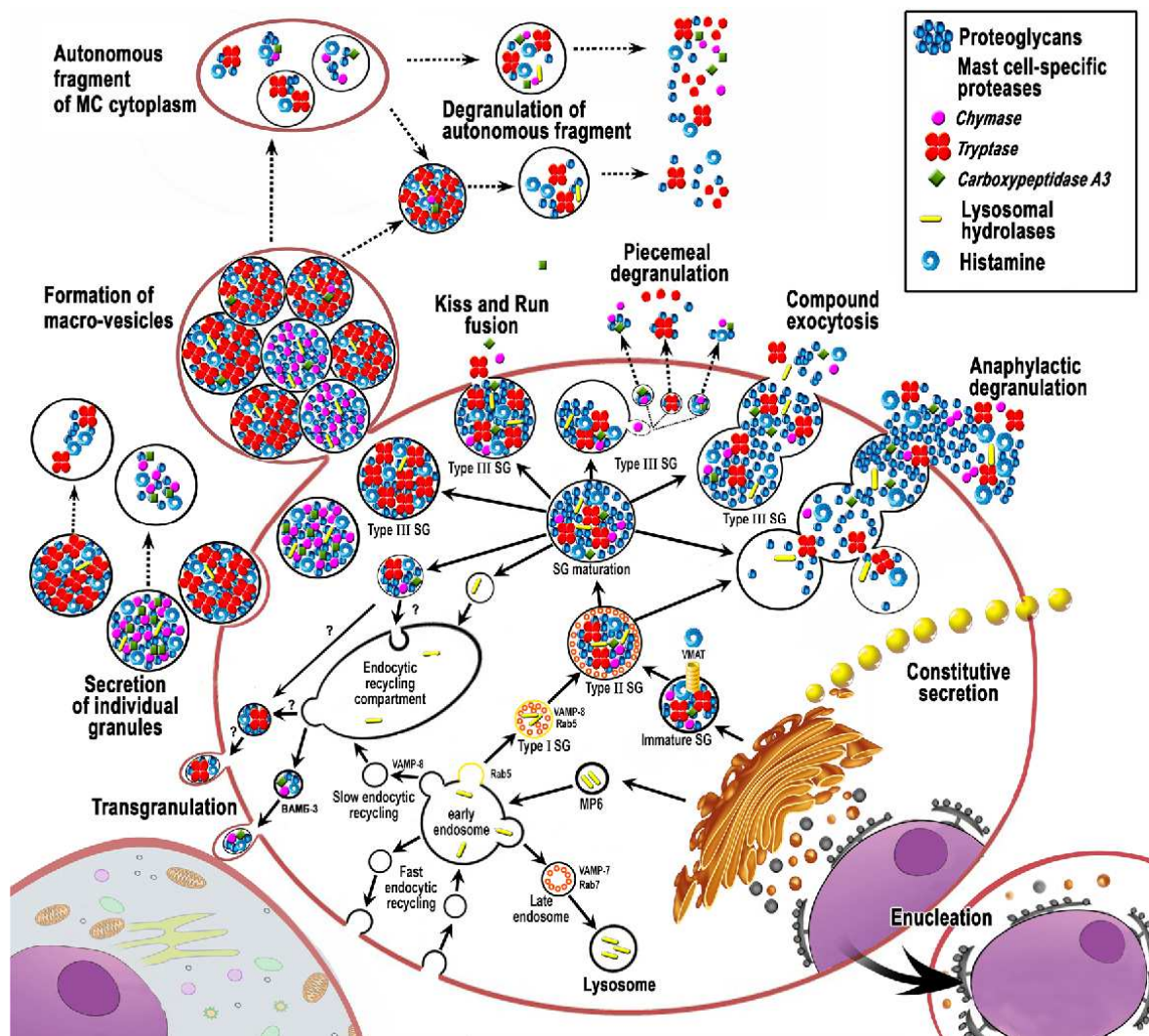


Figure 5 : Voies sécrétoires des mastocytes.

[Figure 4 de (Atiakshin *et al.*, 2019) reproduite avec la permission]

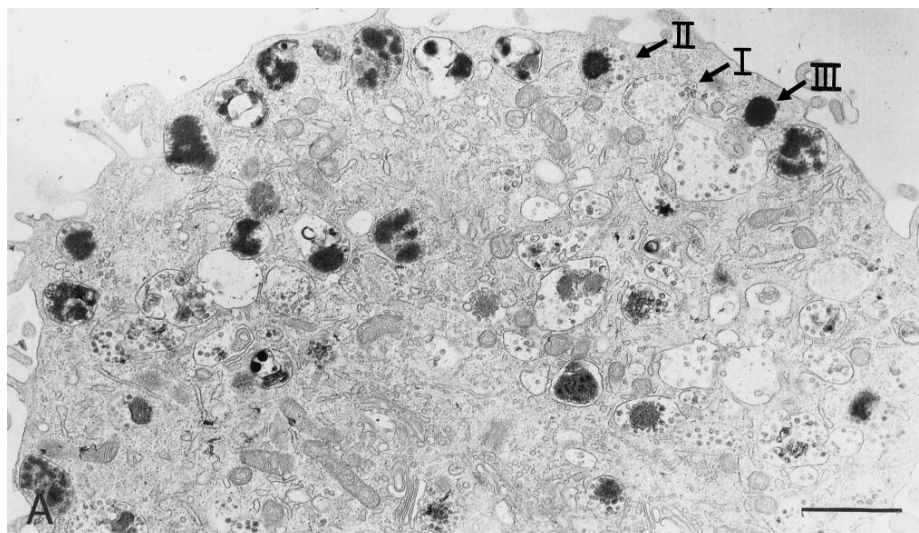


Figure 6 : Morphologie des granules mastocytaires. Visualisation des 3 types de granules mastocytaires (type I, II et III) par microscopie électronique.

[Figure 3 de (Raposo *et al.*, 1997) reproduite avec la permission]

2.4 Modulation pharmacologique de l'exocytose chez les mastocytes

Plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux fonctions et à la survie mastocytaire afin de mettre en lumière l'implication des différents médiateurs libérés dans le développement de diverses pathologies inflammatoires et cardiovasculaires (Bot *et al.*, 2008). Dans le cadre de ce projet, nous avons respectivement utilisé le C48/80 et le cromolyn en tant que sécrétagogue et stabilisateur mastocytaire, afin d'évaluer les propriétés pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* de la mMCP-4 contenue dans les granules mastocytaires.

2.4.1 Activation des mastocytes par le C48/80

Le C48/80 est un composé polymérique, produit par une réaction de condensation du N-méthyl-p-méthoxyphénéthylamine avec le formaldéhyde. C'est un composé largement utilisé en tant qu'activateur non-immunologique des mastocytes. Il a été caractérisé comme étant un activateur de la relâche d'histamine pour la première fois en 1951 (Paton, 1951). Le

C48/80 active et dégranule spécifiquement les mastocytes via les récepteurs Mrgprb2, provoquant ainsi des réponses inflammatoires dans divers modèles animaux. Il a été démontré que l'injection intrapéritonéale de C48/80 chez le rat induit la dégranulation et la libération de médiateurs par les CTMC présents au niveau du péritoine de manière dose-dépendante (Irman-Florjanc et Erjavec, 1983). L'induction de l'exocytose par le C48/80 peut être observée au microscope optique (Riley et West, 1955; Mota, 1963). Les MMC semblent toutefois insensibles à l'action du C48/80 puisqu'aucun changement morphologique n'est observé dans ces cellules après l'administration de doses susceptibles de provoquer une dégranulation complète (Enerbäck, 1966). À titre informatif, une liste des sécrétagogues connus est répertoriée dans le Tableau 3.

2.4.2 Stabilisation des mastocytes par le cromolyn

Le cromolyn, aussi connu sous le nom de cromoglycate disodium, a été synthétisé pour la première fois en 1965 dans le but de développer un analogue de la khelline, un bronchodilatateur (Shapiro et König, 1985). D'abord reconnu pour son potentiel thérapeutique dans le traitement de l'asthme, il a été utilisé dans l'étude des réactions anaphylactiques dans des modèles animaux et dans l'inhibition de la relâche des médiateurs inflammatoires par l'activation immunologique et non-immunologique des mastocytes (Sinniah *et al.*, 2017). Malgré que le cromolyn ait été approuvé par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration*, ou FDA) en 1973, le mécanisme d'inhibition est très peu connu dans la littérature. Il est probable que cette stabilisation soit médiée par l'inhibition de l'influx de calcium extracellulaire nécessaire à l'initiation de la dégranulation (Foreman et Garland, 1976). Le cromolyn s'est avéré efficace dans plusieurs modèles animaux, dont le rat, la souris, le primate et l'humain (Assem et Mongar, 1970; Goose et Blair, 1969; Samoszuk et Corwin, 2003). Il est intéressant de noter que la stabilisation des mastocytes ne se limite pas aux réactions IgE-dépendante, mais également à l'activation non-immunologique des mastocytes par le C48/80, par exemple comme décrit dans les travaux de Orr *et al.* (1971). Une liste des stabilisateurs mastocytaires connus est répertoriée dans le Tableau 4.

Tableau 3 : Sécrétagogues et activateurs des mastocytes.

Nom	Mécanismes	Nature du composé	Références
Anaphylatoxin C3a ou C5a	Ligand du récepteur du complément C3aR ou C5aR	Peptide endogène	(Mousli <i>et al.</i> , 1994)
Calcium ionophore A23187	Augmente le calcium intracellulaire	Transporteur d'ions de Ca^{2+} , de Mg^{2+}	(Yecies <i>et al.</i> , 1979)
C48/80	Agoniste des récepteurs mrgprb2	Composé non peptidique	(Rothschild, 1970; McNeil <i>et al.</i> , 2015)
Cortistatin-14	Agoniste des récepteurs mrgprb2	Neuropeptide endogène	(Robas <i>et al.</i> , 2003; Subramanian <i>et al.</i> , 2011)
Mastoparan	Agoniste des récepteurs mrgprb2 Activateur de la voie de signalisation de la PLA_2 et PLC	Composé provenant du venin de la guêpe	(Higashijima <i>et al.</i> , 1990; Mousli <i>et al.</i> , 1990; Jones et Howl, 2006)
Morphine	Activation de la voie de signalisation de la PLC	Opioïde	(Casale <i>et al.</i> , 1984)
Neomycin	Activation des récepteurs PTX	Antibiotique	(Aridor et Sagi-Eisenberg, 1990)
PAMP[9-20]/PAMP-12	Agoniste des récepteurs mrgprb2	Analogue tronqué de la proadrénomédulline [1-20]	(Kamohara <i>et al.</i> , 2005)
Substance P	Agoniste des récepteurs PTX Activation de la voie de signalisation de la PLC Agoniste des récepteurs NK-1 et mrgprb2	Neuropeptide de la famille des tachykinines	(Ferry <i>et al.</i> , 2001; Tatemoto <i>et al.</i> , 2006; Bot <i>et al.</i> , 2010)

Abréviations : Ca^{2+} , calcium ; C48/80, composé 48/80 ; Mg^{2+} , magnésium ; NK-1, neurokinin 1 ; PAMP, motifs moléculaires associés aux pathogènes ; PLA_2 , phospholipase A₂ ; PLC, phospholipase C ; PTX, toxine pertussis.

Tableau 4 : Stabilisateurs et inhibiteurs de la dégranulation des mastocytes.

Nom	Mécanismes	Classe thérapeutique	Références
Bepostatine	Antagoniste sélectif des récepteurs H_1 de l'histamine	Antihistaminique	(Kato <i>et al.</i> , 1997)
Cromolyn	Prévient l'influx de calcium intracellulaire (?)	Stabilisateur mastocytaire	(Cox, 1971)
Ketotifen	Antagoniste des récepteurs H_1 de l'histamine	Antihistaminique	(Castillo <i>et al.</i> , 1991)
Lodoxamide	Prévient l'influx de calcium intracellulaire (?)	Stabilisateur mastocytaire	(Case, 1982)
Nedocromil	Inhibiteur de la synthèse des prostaglandines et leucotriènes	Stabilisateur mastocytaire	(Shaw et Kay, 1985)
Olopladine	Antagoniste des récepteurs H_1 de l'histamine Inhibiteur du récepteur ICAM-1	Antihistaminique et stabilisateur mastocytaire	(Sharif <i>et al.</i> , 1996)
Pemirolast	Antagoniste des récepteurs H_1 de l'histamine Inhibiteur des canaux calciques	Antihistaminique et stabilisateur mastocytaire	(Yamashita <i>et al.</i> , 1999)
Tranilast	(?)	Antiallergique	(Azuma <i>et al.</i> , 1976)

Abréviations : H_1 , histaminique ; ICAM-1, molécule d'adhésion intercellulaire 1.

3 LA CHYMASE

3.1 Caractéristiques générales de la chymase

Synthétisées et emmagasinées au niveau des granules de sécrétion des mastocytes, les chymases ont été identifiées pour la première fois en 1959 (Benditt, 1959). Ce sont des endopeptidases monomères appartenant à la famille des sérines protéases présentant des spécificités analogues à la chymotrypsine, c'est-à-dire qu'elles clivent préférentiellement le côté carboxylique d'un lien peptidique suivant un acide aminé aromatique comme la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane (Pejler *et al.*, 2007). Aussi, cette classe d'enzyme se distingue par la présence de trois résidus d'acides aminés qui interviennent ensemble dans le site actif formant la triade catalytique. Cette triade catalytique fait intervenir un résidu acide, basique et nucléophile. Dans le cas de la chymase, il s'agit de l'acide aspartique-102, l'histidine-57 et la sérine-195 (Carter et Wells, 1988; Reiling *et al.*, 2003).

3.2 Classification des chymases mastocytaires

Plusieurs chymases identifiées chez différentes espèces ont été divisées en deux groupes, soit les α -chymases et les β -chymases, divisées en fonction de leur structure et leur spécificité de substrats (Gallwitz et Hellman, 2006). On ne retrouve qu'une seule α -chymase chez l'humain. Chez la souris, on retrouve plusieurs isoformes de protéases mastocytaires (mMCP). Parmi celles-ci, on retrouve une seule α -chymase (mMCP-5) et trois β -chymases (mMCP-1, mMCP-2 et mMCP-4). Basée sur la similarité de séquence, mMCP-5 semble être l'homologue le plus probable de la chymase humaine. Par contre, un essai de spécificité de clivage a permis de démontrer que l'activité enzymatique de la mMCP-5 s'apparente à celle de l'élastase (Kunori *et al.*, 2002). Également, mMCP-1 et mMCP-2 ont des localisations tissulaires et des activités enzymatiques absentes ou différentes de la chymase humaine (Pejler *et al.*, 2010). La mMCP-4, en revanche, est celle qui présente le plus d'homologie fonctionnelle avec la chymase humaine au niveau de son activité enzymatique de type chymotrypsine, de sa spécificité de substrat, de sa localisation tissulaire, mais également au

niveau de ses propriétés de liaison avec un protéoglycane (Tchougounova *et al.*, 2003; Pejler *et al.*, 2010; Semaan *et al.*, 2015). Le Tableau 5 présente les caractéristiques des différentes chymases en fonction de leurs types cellulaires chez l'humain et la souris.

Tableau 5 : Caractéristiques des différentes chymases retrouvées dans les mastocytes humains et de souris. [Informations tirées de (Pejler *et al.*, 2010)]

Espèce	Sous-type mastocytaire	Enzyme	Gène	Activité protéolytique
Humain	MC _{TC}	α -chymase	<i>CMA1</i>	Activité chymotrypsine
	MC _T	-	-	-
Souris	CTMC	α -chymase (mMCP-5)	<i>mcpt5</i>	Activité élastase
		β -chymase (mMCP-4)	<i>mcpt4</i>	Activité chymotrypsine
	MMC	β -chymase (mMCP-1)	<i>mcpt1</i>	Activité chymotrypsine
		β -chymase (mMCP-2)	<i>mcpt2</i>	Inactive

Abréviations : CTMC, mastocytes des tissus conjonctifs ; MCT, mastocytes positifs pour la tryptase ; MCTC, mastocytes positifs pour la tryptase et la chymase ; MMC, mastocytes des tissus muqueux ; mMCP, protéase mastocytaire murine.

3.3 Activation et inhibition physiologique de la chymase

La chymase est d'abord synthétisée au niveau du RE rugueux, sous forme de proenzyme inactive. Avant d'être stockée à l'intérieur des granules de sécrétion, elle doit subir une maturation qui consiste au clivage d'un dipeptide acide en position N-terminal par la dipeptidyl peptidase I (DPPI), aussi appelée Cathepsine C. La liaison de la chymase inactive à l'héparine, jouant le rôle de protéoglycane chargé négativement, favorise un repliement favorable de la proenzyme de façon à ce que le dipeptide soit exposé et clivé par la DPPI. Le clivage provoque un rapide changement conformationnel empêchant un second clivage par la DPPI et permettant l'activation de l'enzyme (Murakami *et al.*, 1995). La schématisation de ces étapes d'activation est présentée dans la Figure 7. Le pH dans les granules de sécrétion est de 5.5, ce qui permet de maintenir la chymase sous forme inactive, dont le pH optimal pour son activité hydrolytique se situe entre 7.0 et 9.0 (Bacani et Frishman, 2006).

Suivant sa sécrétion dans la matrice extracellulaire, la chymase peut être rapidement inhibée de manière irréversible par des protéines plasmatiques appartenant à la famille des serpins, dont l' α_1 -antitrypsine, l' α_2 -antichymotrypsine et l' α_1 -inhibiteur de protéinase (Schechter *et al.*, 1989). Dans la circulation systémique, la chymase active est captée par

l' α_2 -macroglobuline, qui emprisonne la chymase active de manière covalente et empêche une activité enzymatique prolongée. À la suite de sa sécrétion par les mastocytes, la chymase reste liée à l'héparine, ce qui peut ralentir de manière significative l'inhibition par les serpins, et contribuer à l'augmentation de sa demi-vie (Walter *et al.*, 1996). De plus, la chymase liée à l'héparine est capable de dégrader l'inhibiteur α_1 -antitrypsine (Lindstedt *et al.*, 2001). Le rôle régulateur de l'héparine dans la modulation de la bioactivité de la chymase peut également se manifester par la sélectivité de ses substrats, la limitation de sa mobilité et la prolongation de son activité enzymatique après dégranulation (Pejler *et al.*, 2007).

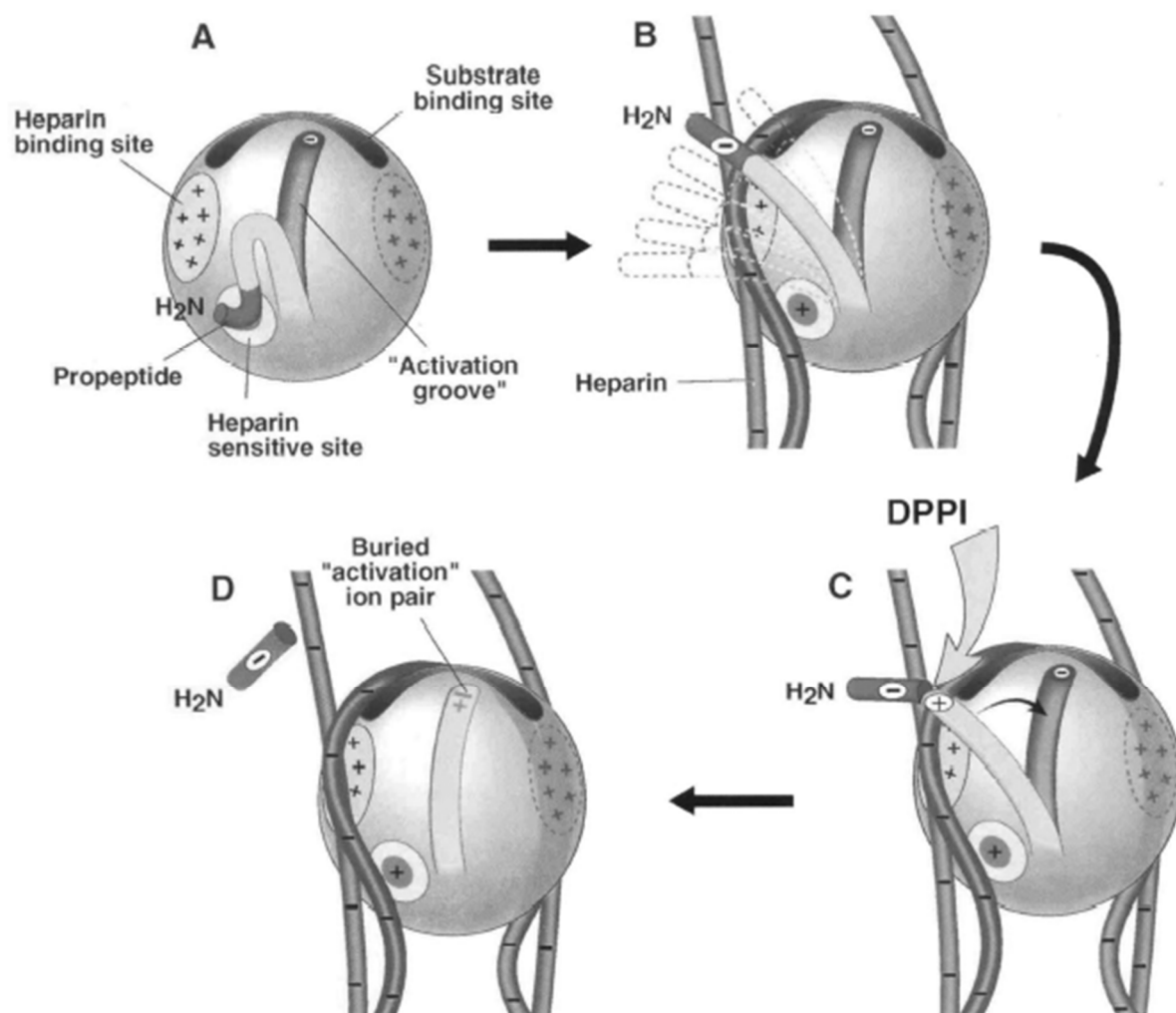


Figure 7 : Mécanisme d'activation de la chymase par la DPPI en présence d'héparine.

[Figure 3 de (Murakami *et al.*, 1995) reproduite avec la permission]

3.4 Substrats de la chymase

La synthèse d'angiotensine II (Ang II) par la chymase est bien documentée dans la littérature (Pejler *et al.*, 2010; Froogh *et al.*, 2017). En effet, la chymase est capable de cliver la liaison Phe⁸-His⁹ de l'angiotensine I (Ang I), pour former le peptide vasoactif. Par ailleurs, la chymase joue également un rôle significatif dans la génération d'ET-1, passant par la production d'endothéline-1 (1-31) (ET-1 (1-31)), un intermédiaire de 31 acides aminés formé par le clivage de la liaison Tyr³¹-Gly³² de la big-endothéline-1 (big-ET-1) par la chymase (Houde *et al.*, 2013). Le Tableau 6 regroupe les principaux substrats de la chymase. Cependant, dans la présente étude, nous nous intéressons à l'étude des propriétés pharmacologiques de la chymase dans un modèle de souris. Une liste de substrats spécifiques pour la mMCP-4 provenant d'études utilisant un modèle animal réprimé pour la mMCP-4 ou l'enzyme recombinante est présentée dans le Tableau 7.

Tableau 6 : Substrats de la chymase.

Substrat	Activité biologique	Référence
Albumine	Dégradation	(Raymond <i>et al.</i> , 2003)
Ang I	Conversion	(Urata <i>et al.</i> , 1990a)
Apolipoprotéine E, A-II	Dégradation	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
Big-ET-1	Conversion	(Nakano <i>et al.</i> , 1997)
Bradikinine	Inactivation	(Reilly <i>et al.</i> , 1985)
Fibronectine	Dégradation	(Lazaar <i>et al.</i> , 2002; Tchougounova <i>et al.</i> , 2003)
Kallikréines	Activation	(Reilly <i>et al.</i> , 1985)
Neurotensine	Hydrolyse	(Goldstein <i>et al.</i> , 1991)
Plasmine	Dégradation	(Tchougounova et Pejler, 2001)
Procollagen	Activation et dégradation	(Kofford <i>et al.</i> , 1997)
Procollagénase	Activation et clivage	(Saarinen <i>et al.</i> , 1994)
Pro-MMP-9	Activation	(Tchougounova <i>et al.</i> , 2005)
SCF	Activation	(Longley <i>et al.</i> , 1997; de Paulis <i>et al.</i> , 1999)
Substance P	Dégradation	(Caughey <i>et al.</i> , 1988)
TGF-β	Activation	(Taipale <i>et al.</i> , 1995)
Thrombine	Dégradation	(Pejler etbKarlström, 1993; Tchougounova et Pejler, 2001)
Vitronectine	Dégradation	(Banovac <i>et al.</i> , 1993)

Abréviations : Ang I, angiotensine I ; Big-ET-1, big-endothéline-1 ; MMP, métalloprotéinase matricielle ; SCF, facteur de cellule souche ; TGF-β, facteur de croissance transformant.

Tableau 7 : Substrats de la mMCP-4.

Substrat	Activité biologique	Référence
Ang I	Conversion	(Caughey <i>et al.</i> , 2000)
Big-ET-1	Conversion	(Fecteau <i>et al.</i> , 2005; Houde <i>et al.</i> , 2013; Semaan <i>et al.</i> , 2015)
Élastine	Dégradation	(Sun <i>et al.</i> , 2009)
Fibronectine	Dégradation	(Tchougounova et Pejler, 2001; Tchougounova <i>et al.</i> , 2003)
IGF-1	Dégradation	(Houde <i>et al.</i> , 2018)
IL-6	Dégradation	(Sun <i>et al.</i> , 2009)
Plasmine	Dégradation	(Pejler <i>et al.</i> , 1994; Tchougounova et Pejler, 2001)
Pro-MMP-9 et pro-MMP-2	Activation	(Tchougounova <i>et al.</i> , 2005)
Thrombine	Dégradation	(Pejler <i>et al.</i> , 1994; Tchougounova et Pejler, 2001)
TNF- α	Dégradation	(Sun <i>et al.</i> , 2009; Piliponsky <i>et al.</i> , 2012)
VEGF	Activation	(Sun <i>et al.</i> , 2009)

Abréviations : Ang I, angiotensine I ; Big-ET-1, big-endothéline-1 ; IGF-1, *insulin-like growth factor 1* ; IL, interleukine ; MMP, métalloprotéinase matricielle ; TNF- α , facteur de nécrose tumorale ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.

3.5 Inhibiteurs pharmacologiques de la chymase

Plusieurs inhibiteurs, présentés dans le Tableau 8, ont différentes puissances et sélectivités pour la chymase et ont été développés dans le but d'évaluer et de limiter la contribution de l'enzyme dans certaines pathologies cardiovasculaires. Par contre, bien que plusieurs de ces inhibiteurs sont adéquats dans le traitement des pathologies chez les modèles animaux, la plupart ont échoué lors des premiers essais cliniques en raison d'effets secondaires indésirables (Ahmad et Ferrario, 2018). Cela pourrait être expliqué en partie en raison de la variabilité dans l'expression génique de la chymase et des fonctions biologiques de l'enzyme chez les différentes espèces. En effet, tel que mentionné plus tôt, les humains possèdent une seule α -chymase, les souris possèdent une α -chymase mais aussi plusieurs β -chymases. La chymase chez l'humain et le chien ne dégrade pas l'Ang II, contrairement à la mMCP-4 et la mMCP-1 chez les rongeurs, qui ont une activité angiotensinase (Miyazaki *et al.*, 2006).

Par ailleurs, plus récemment, le Fulacimstat (ou BAY1142526), un inhibiteur de la chymase active pouvant être administré par voie orale, est actuellement en cours de développement par Bayer Healthcare (Kanefendt *et al.*, 2019). Des études préliminaires

démontrent que le Fulacimstat permet d'améliorer les fonctions cardiaques post-infarctus chez le hamster, et de limiter le remodelage anormal des tissus ventriculaires chez le chien (Bayer Pharma Aktiengesellschaft, 2017; Ahmad et Ferrario, 2018). Ce médicament est présentement en phase clinique II chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde et présentant un dysfonctionnement du ventricule gauche (CHIARA MIA 2) (NCT: 02976467), et également chez des patients diabétiques de type II atteint de néphropathie diabétique (NCT: 03412006).

Tableau 8 : Espèces chez lesquelles les inhibiteurs de la chymase ont été validés. [Adapté de (Heuston et Hyland, 2012)]

Inhibiteurs	Cible	Modèle animal	Références
SUN-C8257	Chymase, cathepsine G	Humain, hamster, chien	(Matsumoto <i>et al.</i> , 2003; Doggrell, 2008)
SUN13834	Chymase, cathepsine G	Souris, humain	(Ogata <i>et al.</i> , 2011)
BCEAB	Chymase	Hamster	(Doggrell, 2008)
Compound 17	Chymase	Mouton	(Doggrell, 2008)
NK3201	Chymase	Hamster	(Doggrell, 2008)
TEI-E548	Chymase	Hamster	(Hoshino <i>et al.</i> , 2003)
RO5066852	Chymase	Souris	(Bot <i>et al.</i> , 2011)
Suc-Val-Pro-Phe ^P (OPh) ₂	Chymase	Hamster, souris	(Soga <i>et al.</i> , 2004; Simard <i>et al.</i> , 2009)
JNJ-10311795; RWJ-355871	Chymase, cathepsine G	Rat, souris, moutons	(de Garavilla <i>et al.</i> , 2005; Maryanoff <i>et al.</i> , 2010)
Y-40613	Chymase	Souris	(Akahoshi <i>et al.</i> , 2001; Imada <i>et al.</i> , 2002)
TY-51469	Chymase	Rat, hamster, cochon,	(Takai <i>et al.</i> , 2009; Kakimoto <i>et al.</i> , 2010; Komeda <i>et al.</i> , 2010; Oyamada <i>et al.</i> , 2011; Houde <i>et al.</i> , 2013)
Chymostatin	Chymase	Lapin	(Doggrell, 2008)
Fulacimstat (BAY1142524)	Chymase	Hamster, chien	(Ahmad et Ferrario, 2018; Kanefendt <i>et al.</i> , 2019)

3.6 Rôle de la chymase en conditions physiopathologiques

Plusieurs études suggèrent l'implication de la chymase dans la progression et le développement de maladies cardiovasculaires (Doggrell et Wanstall, 2004). La production chymase-dépendante d'Ang II au niveau cardiaque semble responsable du remodelage

ventriculaire. En effet, la chymase provoque l'augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire, induite par la dégradation directe de la fibronectine et de la digestion autophagique du procollagène et de la vitronectine (Vartio *et al.*, 1981; Saarinen *et al.*, 1994; Dell'Italia *et al.*, 2018). La chymase est également impliquée dans l'activation de la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9) (Tchougounova *et al.*, 2005). Plus récemment, il a été démontré que la chymase induit l'apoptose des cellules musculaires lisses dérivées de l'aorte chez le rat, selon un mécanisme impliquant la dégradation de la fibronectine et provoquant ainsi l'activation de la caspase-8 et de la caspase-9 (Leskinen *et al.*, 2003; Dell'Italia *et al.*, 2018). La chymase est aussi impliquée dans la libération et l'activation du facteur de croissance tumorale (TGF- β 1). Celui-ci est connu pour jouer un rôle dans la formation des lésions athérosclérotiques, où il régule la différenciation, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, et la synthèse et la sécrétion de la matrice extracellulaire (Wang *et al.*, 2001). La chymase est également impliquée dans le métabolisme lipidique par l'hydrolyse des lipoprotéines de basse densité (LDL), contribuant à l'accumulation de cholestérol à la progression de la plaque athérosclérotique (Kokkonen et Kovanen, 1989). Finalement, l'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire. La chymase clive le précurseur de l'IL-1 β en IL-1 β active (Mizutani *et al.*, 1991).

4 L'ENDOTHÉLINE-1

4.1 Historique

La présence d'un facteur ayant des propriétés vasoconstrictrices isolés à partir du milieu de culture de cellules endothéliales aortiques a été mis en évidence pour la première fois en 1985 (Hickey *et al.*, 1985). Sa structure protéique a été caractérisée puis a été nommée endothéline, puis endothéline-1 en 1988 (Yanagisawa *et al.*, 1988). Étant l'agent vasoconstricteur le plus puissant à ce jour (Davenport *et al.*, 2016), l'ET-1 joue un rôle important dans le contrôle et la régulation de la pression artérielle. Ce rôle fait du système endothélial, l'un des systèmes régulateurs principaux contribuant à la physiopathologie des maladies cardiovasculaires (Böhm et Pernow, 2007).

4.2 Structure et biosynthèse de l'endothéline-1

L'ET-1 fait partie d'une famille de peptides constitués de 21 acides aminés possédant deux ponts disulfures (Cys¹-Cys¹⁵ et Cys³-Cys¹¹). Cette famille comporte trois isoformes ayant une grande homologie dans leur séquence d'acides aminés, soit l'ET-1, l'endothéline-2 (ET-2) et l'endothéline-3 (ET-3), tous codés par un gène différent. La synthèse de l'ET-1 implique l'expression d'un gène codant pour la préproendothéline-1 (préproET-1) qui est d'abord clivée en un propeptide inactif, la proET-1, par une peptidase signal, puis en big-ET-1 par une enzyme appartenant à la famille des subtilisines, la furine (Denault *et al.*, 1995). Le peptide vasoactif, l'ET-1, est produit par le clivage protéolytique du lien Trp²¹-Val²² par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Tsukahara *et al.*, 1993). Une voie alternative de la biosynthèse de l'ET-1 fait intervenir la chymase, qui clive au niveau de la Tyr³¹ de la big-ET-1 pour former un intermédiaire inactif, l'ET-1 (1-31). L'ET-1 est ensuite produite par un clivage protéolytique de la liaison Trp²¹-Val²² de l'ET-1 (1-31) par la néprilysine (NEP). La schématisation de la biosynthèse de l'ET-1 est présentée dans la Figure 8.

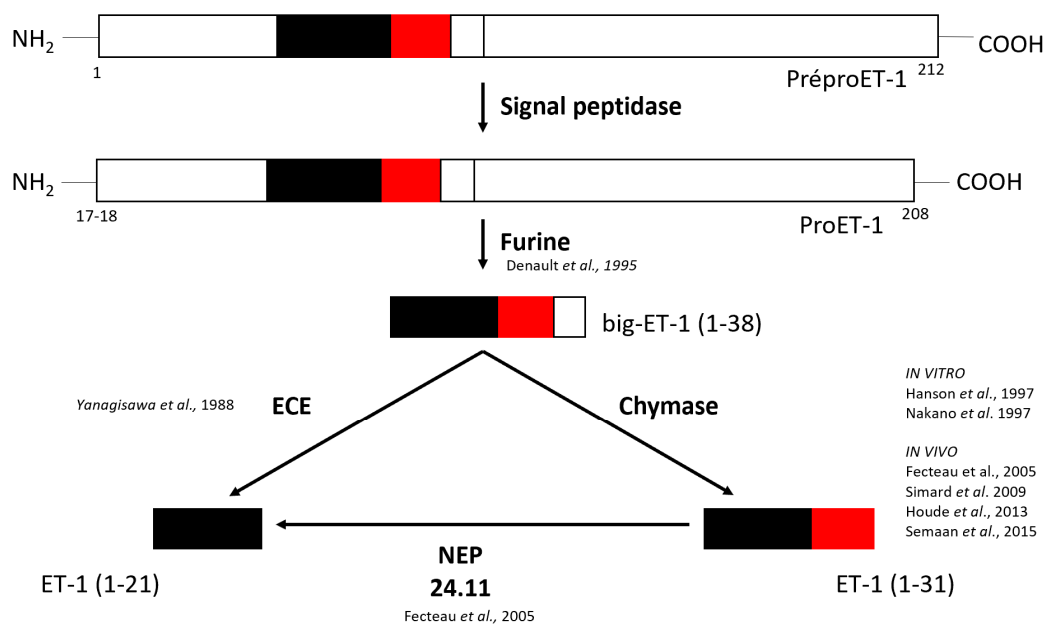


Figure 8 : Biosynthèse de l'ET-1. [Adaptée de (D'Orléans-Juste *et al.*, 2003)]

4.2.1 Voie dépendante de l'enzyme de conversion de l'endothéline-1

Il existe deux isoformes de l'enzyme de conversion de l'ET-1 : ECE-1 et ECE-2. L'ECE-1 appartient à la famille des métalloprotéinases membranaires de type II et présente une activité protéolytique optimale à pH 7.0 (Davenport *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 1994). L'ECE-1 possède 4 isoformes (ECE-1a, b, c et d), dérivés d'un seul gène et produit par épissage alternatif. Ces isoformes diffèrent par leur localisation tissulaire et par leur séquence en acides aminés de l'extrémité N-terminale. Ils montrent une efficacité de conversion similaire de la big-ET-1 (Jeng *et al.*, 2002). L'ECE-2 fait également partie de la famille des métalloprotéases liées à la membrane et possède une similarité de séquence de 59% avec l'ECE-1. Comme pour l'ECE-1, il existe 4 isoformes de l'ECE-2, différant par leur localisation tissulaire et leur terminaison amino-terminale. Contrairement à l'ECE-1, le pH optimal pour l'activité catalytique de l'ECE-2 est de 5.5, ce qui pourrait suggérer un rôle potentiel de l'enzyme en conditions de faible pH, notamment dans l'ischémie (Davenport *et al.*, 2016).

4.2.2 Voie dépendante de la chymase mastocytaire

La découverte d'une voie alternative de production d'ET-1 a été mise en évidence par Yanagisawa *et al.* (2000). Cette équipe de recherche a montré que l'absence de l'ECE-1, en combinaison avec l'ECE-2 ou non, est létale au niveau embryonnaire chez la souris. Ils ont toutefois détecté une quantité significative d'ET-1 tissulaire chez les embryons doubles KO (ECE-1 (-/-)/ECE-2 (-/-)), montrant le potentiel d'autres voies de la synthèse de l'ET-1 indépendantes des ECE (Yanagisawa *et al.*, 2000). En effet, la chymase est impliquée dans la voie de maturation de l'ET-1 et peut convertir la big-ET-1 en ET-1 (1-31) (Fecteau *et al.*, 2005). Plus récemment, des études au sein de notre laboratoire (Fecteau *et al.*, 2005; Simard *et al.*, 2009) ont démontré que l'ET-1 (1-31), produite par la chymase, doit subir une hydrolyse par la NEP afin de produire l'ET-1, le peptide actif responsable de l'effet vasopresseur chez la souris *in vivo*. D'autres résultats publiés par notre laboratoire ont montré une inhibition totale de la formation d'ET-1 (1-31) par des mastocytes péritonéaux en présence d'un inhibiteur de la chymase, le TY-51469, ou par les mastocytes dont le gène

exprimant la mMCP-4 a été réprimé. Ces résultats confirment d'abord la capacité de la mMCP-4 mastocytaire à générer l'ET-1 (1-31), mais démontrent également qu'aucune autre protéase mastocytaire n'est impliquée dans cette voie métabolique (Semaan *et al.*, 2015). Notre équipe de recherche a également démontré que l'isoforme murin de la chymase, la mMCP-4, était responsable d'environ 50% des propriétés vasopressives issues de la production d'ET-1 suite à l'injection du précurseur, la big-ET-1, chez la souris anesthésiée, venant ainsi confirmer l'importance de la voie chymase-dépendante dans la maturation de l'ET-1 (Houde *et al.*, 2013).

4.3 Les récepteurs de l'endothéline-1

4.3.1 Signalisation des récepteurs de l'endothéline-1

L'ET-1 est principalement produite par les cellules endothéliales vasculaires, mais également par d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales dans les poumons, les reins et le côlon, les macrophages et les monocytes, les cellules gliales périphériques et du plexus choroïde et certaines neurones et cellules gliales du système nerveux central (Davenport *et al.*, 2016).

Les réponses pharmacologiques induites par l'ET-1 passent par sa liaison aux récepteurs spécifiques aux endothélines, les récepteurs ET_A et ET_B. Les récepteurs de l'endothéline font partie de la superfamille des récepteurs possédant 7 domaines transmembranaires, les RCPG (Douglas *et al.*, 1995). Les récepteurs ET_A sont sélectifs et peuvent lier l'ET-1 et l'ET-2 avec une haute affinité (K_d 3×10^{-11} – 1×10^{-9} M) (Kondo *et al.*, 1994; Davenport *et al.*, 1995; Bacon et Davenport, 1996), mais également l'ET-3 avec une plus faible affinité (K_d 4×10^{-9} M) (Desmarets *et al.*, 1996). Le récepteur ET_B est non-sélectif et peut lier les 3 isoformes avec une affinité similaire (K_d 2.5×10^{-11} – 2×10^{-10} M) (Williams *et al.*, 1991; Molenaar *et al.*, 1992; Russell et Davenport, 1996). ET_A est principalement exprimé dans les cellules musculaires lisses et dans le muscle cardiaque et est à l'origine des effets vasoconstricteurs, tandis que ET_B est exprimé dans l'endothélium vasculaire et est responsable de la vasodilatation via la libération de l'oxyde nitrique (NO) synthase, causant un relargage de NO et de prostanoïdes (Tableau 9). Les récepteurs ET_B sont divisés en 2

sous-types se distinguant par leur localisation (endothélial et muscle lisse), leur fonction (relaxation et contraction) et leur voie de signalisation cellulaire. Les caractéristiques des différents types de récepteurs de l'endothéline sont présentées dans le Tableau 9 (Masaki et Yanagisawa, 1992; Douglas *et al.*, 1995; Mazzuca et Khalil, 2012).

Tableau 9 : Caractéristiques des sous-types de récepteurs de l'endothéline. [Adapté de (Mazzuca et Khalil, 2012)]

	ET _B endothélial	ET _B des cellules musculaires lisses	ET _A
Gène	<i>EDNRB</i>	<i>EDNRB</i>	<i>EDNRA</i>
Chromosome	Chromosome 13	Chromosome 13	Chromosome 4
Structure	442 acides aminés	442 acides aminés	427 acides aminés
Sélectivité	ET-1 = ET-2 = ET-3	ET-1 = ET-2 = ET-3	ET-1 > ET-2 >> ET-3
Poids moléculaire	≈ 50 kDa	≈ 50 kDa	≈ 59 kDa
Protéine G	Protéines G	G _q , G ₁₁ , G _{12/13} , G _i , G _o	G _q , G ₁₁ , G _{12/13} , G _s , G _o
Médiateurs de la voie de signalisation de la protéine G	NO, Ca ²⁺ , PGL ₂ , EDHF	PLCβ, PLD, Ca ²⁺ , PKC, MAPK	PLCβ, PLD, Ca ²⁺ , PKC, MAPK
Effets sur les cellules musculaires lisses	Relaxation	Contraction	Contraction et croissance
Effets physiologiques	- Vasodilation - Clairance de l'ET-1 - ↓ libération de la rénine - ↑ l'excrétion de l'eau et du Na ⁺ - ↑ débit sanguin médullaire rénal	- Vasoconstriction - ↑ résistance vasculaire	- Vasoconstriction - Remodelage vasculaire - ↓ débit sanguin rénal et filtration glomérulaire

Abréviations : Ca²⁺, calcium ; EDHF, facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ; ET, endothéline ; kDa, kilodalton ; MAPK, *mitogen-activated protein kinase* ; Na⁺, sodium ; NO, oxyde nitrique ; PGL₂, prostaglandine L2 ; PLCβ, phospholipase Cβ ; PLD, phospholipase D ; PKC, protéines kinase C.

Suivant l'activation par l'ET-1, les deux types de récepteurs sont rapidement internalisés. Le récepteur ET_A est internalisé puis recyclé à la surface de la cellule, alors que le récepteur ET_B est dégradé via la voie lysosomale (Bremnes *et al.*, 2000). Ce mécanisme serait impliqué dans la clairance de l'ET-1 et médié par le récepteur ET_B. En effet, l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_B (BQ-788) prolonge la demi-vie de l'ET-1 (Fukuroda *et al.*, 1994; Ozaki *et al.*, 1995).

4.3.2 Effet pharmacologique de l'endothéline-1

L'administration par voie intraveineuse de l'ET-1 induit d'abord une diminution de la pression artérielle via l'activation des récepteurs ET_B et la relâche de NO par les cellules endothéliales. Cette brève dépression est suivie d'une augmentation prolongée de la pression artérielle via l'action directe de l'ET-1 sur les récepteurs ET_A à la surface des cellules musculaires lisses.

5 L'ANGIOTENSINE II

5.1 Le système rénine-angiotensine

Tout comme le système endothélinergique, le système rénine-angiotensine (SRA) fait partie des principaux régulateurs de l'homéostasie cellulaire et du tonus vasculaire. Ce sont les travaux de Tigerstedt et Bergman (1898) qui ont d'abord mené à la découverte de la rénine, suite à l'observation d'effets presseurs provoqués par des extraits de tissus rénaux de lapin. L'angiotensine, quant à elle, a été découverte simultanément par deux équipes de recherche qui l'ont nommé « angiotinine » et « hypertensine » (Skeggs *et al.*, 1956; Bumpus *et al.*, 1957). Elle sera par la suite baptisée officiellement angiotensine.

Le SRA est un système endocrinien et paracrine complexe impliqué dans la régulation de la pression artérielle et dans l'équilibre hydroélectrolytique de l'organisme. Cet équilibre repose principalement sur l'activité biologique de l'Ang II, dont la production dépend de la présence et de l'activité de la rénine. Cependant, tel que mentionné dans le Tableau 7, l'Ang I est également connue pour être un substrat de la mMCP-4 *in vitro* et *in vivo* (Caughey *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2010). Ainsi, dans le cadre des travaux présentés dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'étude de la contribution mMCP-4-dépendante dans la génération d'Ang II à partir du précurseur, dans un modèle *in vivo* d'exocytose mastocytaire chez la souris.

5.2 Structure et biosynthèse de l'angiotensine II

5.2.1 Voie dépendante de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

L'Ang II est le principal effecteur du SRA. La voie classique de la production d'Ang II débute par la synthèse d'un précurseur glycoprotéique inactif composé de 452 acides aminés libéré au niveau hépatique, l'angiotensinogène. Ce précurseur doit subir un clivage par la rénine, une enzyme de type aspartate-endopeptidase synthétisée sous forme de pro-rénine et emmagasinée dans les cellules juxtaglomérulaires du rein (Morgan *et al.*, 1996). La rénine est donc l'enzyme limitante dans la production d'Ang II. Cette étape permet de générer le décapeptide Ang I suite à l'action protéolytique de la rénine sur la liaison Leu¹⁰-Val¹¹ en N-terminale de l'angiotensinogène. Finalement, l'Ang I est convertie en Ang II par le clivage du lien Phe⁸-His⁹ par une carboxypeptidase nommée l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) (Urata *et al.*, 1990b; de Gasparo *et al.*, 2000). L'ECA est localisée principalement dans les cellules de l'endothélium vasculaire pulmonaire, mais peut également être exprimée par d'autres types cellulaires tels que les macrophages et les cellules de l'endothélium rénal. Elle fait partie de la famille des métalloprotéases en raison de la présence d'un ion zinc dans son site actif. Cette enzyme est liée à la membrane des cellules endothéliales avec son site catalytique exposée à la surface extracellulaire (Borland *et al.*, 1998). Elle est retrouvée dans le cœur, dans le cerveau, dans les vaisseaux sanguins, dans le foie, les reins et les organes reproducteurs. Toutefois, l'ECA n'est pas exclusivement une enzyme tissulaire, elle peut aussi se retrouver dans la circulation plasmatique (Corvol *et al.*, 1995; Turner et Hooper, 2002).

5.2.2 Voie dépendante de la chymase mastocytaire

Des études effectuées chez la souris ont montré qu'un traitement aigu aux inhibiteurs de l'ECA (100 mg/kg de lisinopril administré par voie intrapéritonéale) diminue de manière significative la génération d'Ang II plasmatique et tissulaire, montrant l'importance de l'ECA dans cette voie métabolique (Campbell *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2010). Cependant, les travaux de Kohara *et al.* (1993) ont permis de mettre en évidence l'existence d'autres voies alternatives de production d'Ang II. En effet, chez des souris saines ou hypertensives, un

traitement chronique avec des inhibiteurs de l'ECA a provoqué une augmentation de la génération d'Ang II plasmatique, jusqu'à un niveau normal.

La chymase humaine est considérée comme une ECA. En effet, elle clive efficacement la liaison Phe⁸-His⁹ de l'Ang I pour produire le métabolite vasoactif, l'Ang II (Reilly *et al.*, 1985). La chymase humaine possède une activité catalytique 20 fois plus élevée que l'ECA pour la conversion de l'Ang I en Ang II. Dans ce contexte, plusieurs études décrivent la chymase comme étant l'enzyme majeur dans la formation d'Ang II au niveau cardiaque (Urata *et al.*, 1990b; Balcells *et al.*, 1997). Tous les sous-types de chymase sont capables de convertir l'Ang I en Ang II. Par contre, certaines β -chymases chez les rongeurs démontrent également une activité angiotensinase (Sanker *et al.*, 1997). Chez la souris, deux chymases sont capables de produire l'Ang II, soit la mMCP-1 et la mMCP-4. En revanche, la mMCP-4 agit également comme une angiotensinase *in vitro* par l'hydrolyse de la liaison Tyr⁴-Ile⁵, menant à la production d'un métabolite inactif. Elle peut toutefois produire l'Ang II *in vivo*, tel que démontré dans les travaux de Wei *et al.* (2010), où la mMCP-4 constitue une ECA efficace lors d'un traitement chronique aux inhibiteurs de l'ECA.

Par ailleurs, on peut observer à la Figure 9, les travaux de Balcells *et al.* (1997) montrant les différences dans la génération physiologique d'Ang II cardiaque par la chymase et l'ECA dans différents modèles animaux. Il est intéressant de noter que chez l'humain, la chymase est l'enzyme principale dans la formation d'Ang II, contrairement à la souris, où l'Ang II est produite de manière prédominante par l'ECA (Balcells *et al.*, 1997).

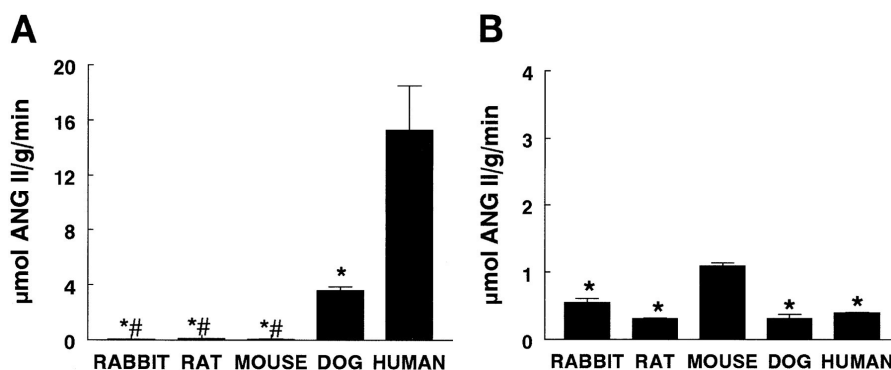


Figure 9 : Contribution de la chymase et de l'ECA dans la production d'Ang II. Formation d'Ang II au niveau cardiaque par (A) la chymase et (B) par l'ECA chez le lapin, le rat, la souris, le chien et l'humain (n=3-8). * $P < 0.05$ vs. humain ; # $P < 0.05$ vs. chien. (Balcells *et al.*, 1997)

5.3 Les récepteurs de l'angiotensine II

5.3.1 Signalisation des récepteurs de l'angiotensine II

L'Ang II est impliquée dans l'homéostasie de la pression artérielle par ses effets sur l'équilibre hydrique et électrolytique, ainsi que sur la résistance vasculaire. L'Ang II agit au niveau de ses cellules cibles par l'intermédiaire de deux récepteurs distincts, les récepteurs à l'Ang II de type 1 (AT₁R) et de type 2 (AT₂R). Sur le plan structurel, les deux récepteurs présentent une similitude de 30% dans leur séquence d'acides aminés. Le gène du proto-oncogène MAS code pour un récepteur à 7 domaines transmembranaires appelé récepteur Mas, pouvant être activé par l'Ang III, un peptide composé de 7 acides aminés dérivé de l'action de l'ECA-2 (Jackson *et al.*, 1988; de Gasparo *et al.*, 2000). Un autre récepteur, le récepteur à l'Ang II de type 4 (AT₄R), a été cloné, mais sa contribution dans les effets du SRA est très faible, car il ne lie que l'Ang IV, un hexapeptide obtenu par délétion des deux premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'Ang II (Wright *et al.*, 1995).

Le récepteur AT₁R est le récepteur majoritairement exprimé dans l'organisme, et ce, de façon ubiquitaire. Il fait partie de la famille des RCPG couplés à une protéine G_q. L'activation de la voie de signalisation intracellulaire fait intervenir plusieurs voies, dont celle des MAPK, qui participe aux réponses pro-inflammatoires, également la voie Akt/PKB qui favorise la migration et l'adhésion cellulaire participant au remodelage vasculaire, et finalement la voie JAK-STAT qui conduit à la survie et à la prolifération cellulaire. Enfin, la stimulation du récepteur AT₁R provoque la contraction des cellules musculaires lisses et une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), des molécules pouvant contribuer à l'hypertension artérielle ou au développement d'autres pathologies cardiovasculaires (Tableau 10) (Touyz et Schiffrin, 2000; Touyz, 2005).

À l'opposé, suivant l'activation par l'Ang II, le récepteur AT₂R est connu pour provoquer des effets vasodilatateurs et anti-trophiques. Il fait également partie de la famille des RCPG, mais celui-ci est couplé à une protéine G_i. Il a été démontré que l'activation de la voie de signalisation d'AT₂R est associée à une augmentation de concentration de GMP cyclique (GMPc) via la bradykinine et son récepteur B2, et à une activation des phosphatases (Tableau 10) (de Gasparo *et al.*, 2000; Lemarié et Schiffrin, 2010). Il est principalement retrouvé au niveau des tissus mésenchymateux du fœtus et des structures cérébrales, où il

possède un rôle essentiel dans le remodelage tissulaire, la vasodilatation et la transmission neuronale (Lemarié et Schiffrin, 2010). Vraisemblablement, chez l'adulte, on retrouve peu de récepteurs AT₂R fonctionnels. Par contre, en situations cardiopathologiques comme l'insuffisance cardiaque, on observe une augmentation de l'expression du récepteur AT₂R, dont le mécanisme est, pour l'instant, peu défini dans la littérature (Xu *et al.*, 2014).

Tableau 10 : Caractéristiques des sous-types de récepteurs de l'angiotensine II. [Adapté de (Touyz et Schiffrin, 2000)]

	AT ₁ R	AT ₂ R
Gène	<i>AGTR1</i>	<i>AGTR2</i>
Chromosome	Chromosome 3	Chromosome X
Structure	359 acides aminés	363 acides aminés
Sélectivité	ET-1 = ET-2 = ET-3	ET-1 = ET-2 = ET-3
Poids moléculaire	≈ 50 kDa	≈ 44 kDa
Protéine G	G _q , G ₁₁	Protéines G
Médiateurs de la voie de signalisation de la protéine G	PLCβ, PLD, PLA ₂ , Ca ²⁺ , MAPK, IP ₃	Phosphatases, GMPc
Effets sur les cellules musculaires lisses	Contraction	Relaxation
Effets physiologiques	<ul style="list-style-type: none"> - Vasoconstriction - Prolifération cellulaire - Hypertrophie cellulaire - ↑ production de ROS et d'ET-1 	<ul style="list-style-type: none"> - Vasodilatation - Inhibition de la croissance - ↑ production de NO - ↑ synthèse de collagène - ↑ production de GMPc

Abréviations : AT₁, récepteur à l'Ang II de type 1 ; AT₂, récepteur à l'Ang II de type 2 ; Ca²⁺, calcium ; cGMP, guanosine monophosphate cyclique ; ET, endothéline ; IP₃, inositol-3-phosphase ; kDa, kilodalton ; MAPK, *mitogen-activated protein kinase* ; NO, oxyde nitrique ; PLA₂, phospholipase A2 ; PLCβ, phospholipase Cβ ; PLD, phospholipase D ; PGL₂, prostaglandine L2 ; ROS, espèce réactive de l'oxygène.

5.3.2 Effet pharmacologique de l'angiotensine II

La liaison de l'Ang II sur le AT₁R induit une contraction des cellules musculaires lisses vasculaires. L'activation du récepteur contribue également à l'augmentation de l'activité sympathique et de la soif, provoquant la réabsorption d'eau au niveau rénal et l'augmentation de la réabsorption des ions sodiques et calciques, ainsi que la sécrétion de potassium. L'Ang II provoque également la libération de deux autres facteurs : l'aldostérone du cortex surrénalien et la vasopressine, une hormone antidiurétique produite par l'adénohypophyse (Weir et Dzau, 1999). Ces éléments auront pour effet d'élever la pression artérielle et d'augmenter le volume circulatoire. À l'atteinte de l'homéostasie, une boucle de rétroaction négative permet d'inhiber la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires.

QUESTION PRINCIPALE

Est-ce que l'activité biologique de la big-ET-1 est influencée par l'état de stabilité mastocytaire *in vitro* et *in vivo*?

BUT DE L'ÉTUDE

Démontrer que l'activité sécrétoire des mastocytes influence la réponse hémodynamique mMCP-4-spécifique à la big-ET-1 chez la souris anesthésiée.

HYPOTHÈSE

Interférer avec la stabilité mastocytaire module significativement la réponse hémodynamique de la big-ET-1 de manière mMCP-4-dépendante.

OBJECTIFS

- ✓ Démontrer que l'activation et la stabilisation mastocytes interfèrent avec leur contenu en mMCP-4;
- ✓ Démontrer que l'activation et la stabilisation des mastocytes interfèrent avec la production mMCP-4-dépendante d'ET-1 (1-31) à partir du précurseur;
- ✓ Étudier l'impact de la modulation de l'exocytose des mastocytes sur la réponse hémodynamique de la big-ET-1.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 ANIMAUX

Les souris C57Bl/6J de type sauvage (WT) proviennent de chez Charles River (St-Constant, QC, Canada) et les souris déficientes pour la protéase mastocytaire de type 4 (mMCP-4 KO) proviennent de géniteurs gracieusement offerts par le professeur Gunnar Pejler de l'Université d'Uppsala en Suède. Les deux colonies de souris sont logées à l'animalerie centrale de notre établissement. Des croisements entre des couples de souris mMCP-4 KO, effectués à l'unité de souris transgénique (UST), permettent le maintien de la colonie à long terme. Tous les animaux sont maintenus dans les conditions de température ambiante (23°C) et d'humidité (78%) constante, dans un cycle lumière/obscurité contrôlé (de 6h à 18h), avec de l'eau et de la nourriture disponible *ad libitum*. Toutes les souris mâles utilisées dans le cadre des travaux présentés dans ce mémoire sont âgées de 8 semaines et plus.

2 PEPTIDES UTILISÉS

Les peptides ainsi que leur provenance sont présentés dans le Tableau 11. La big-ET-1, l'ET-1 (1-31)), l'ET-1, l'Ang I et le cromolyn sont reconstitués dans une solution de saline tamponnée au phosphate (PBS) à pH 7.4 (P4417-100TAB ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis). Le C48/80 est reconstitué dans de l'eau distillée selon les recommandations du fabricant. Le substrat fluorogénique [Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC] est reconstitué dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Le substrat colorimétrique [RETF-4NA] est reconstitué dans 10 mM PBS pH 7.4, 0.01% triton x-100 et 0.05% DMSO. Le TY-51469 est dilué dans une solution de 0.1 N de NaOH : 10 mM PBS pH 7.4 selon un ratio de 1:3. Une fois reconstitués, tous les peptides et composés sont aliquotés et peuvent être conservés à -20°C jusqu'à l'utilisation. Afin d'atteindre la concentration exigée, tous les composés sont dilués dans 10 mM PBS pH 7.4, à l'exception des substrats AMC et RETF-4NA qui sont dilués dans 10 mM PBS pH 8.0. Tous les véhicules se sont révélés sans effet sur les paramètres étudiés dans chacune des séries d'expériences.

Tableau 11 : Liste des composés peptidiques et inhibiteurs.

Peptide ou composé	Provenance	Code du produit
[Pro ¹¹ , D-Ala ¹²] Ang I	American Peptide Company; Sunnyvale, CA, États-Unis	-
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Peptide Institute Inc.; Osaka, Japon	3120-V
RETF-4NA	TOCRIS Bioscience; Ellisville, Missouri, États-Unis	3841
Big-ET-1 (1-38) humaine	Phoenix Pharmaceuticals Inc.; Burlingame, Californie, États-Unis	023-10
ET-1 (1-31) humaine	Peptide Institute Inc.; Osaka, Japon	4360-S
ET-1 humaine	Enzo Life Sciences Inc.; Farmingdale, New York, États-Unis	ADI-900-022
Ang I humaine	TOCRIS Bioscience; Ellisville, Missouri, États-Unis	12-7-30
Cromolyn	Sigma-Aldrich; Saint-Louis, Missouri, États-Unis	C0399
C48/80	Sigma-Aldrich; Saint-Louis, Missouri, États-Unis	C2313
TY-51469	Toa Eiyo Ltd.; Osaka, Japon	-

Abréviations : Ang I, angiotensine I ; AMC, 7-amino-4-méthylcoumarin ; big-ET-1, big-endothéline-1 ; ET-1 (1-31), endothéline-1 (1-31) ; ET-1, endothéline-1 ; C48/80, composé 48/80.

3 MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

3.1 Vérification du géotypage des souris

3.1.1 *Extraction d'ADN*

Pour s'assurer du géotype *knockout* (KO) de nos souris, des bouts de queue des souris, d'une longueur d'environ 1 cm, sont prélevés puis conservés à -80°C. L'ADN génomique est extrait à l'aide du *Tissue DNA kit* (D-3396-01 ; OMEGA bio-tek, Norcross, Géorgie, États-Unis) selon les recommandations du fabricant. Les bouts de queue sont d'abord digérés dans une solution de protéases OB (20 mg/ml) et incubés à 55°C pendant 1h en prenant soin de vortexer toutes les 20 minutes pour favoriser la lyse complète des cellules et la libération de leur contenu nucléique. Après plusieurs étapes de centrifugation et de nettoyage, l'échantillon est ensuite placé sur une colonne *HiBind DNA mini column*. Une étape d'élution est effectuée par l'ajout de deux volumes consécutifs de 100 µl de tampon d'élution préalablement chauffé à 70°C. Une centrifugation est nécessaire pour récolter l'ADN qui peut ensuite être conservé à -20°C.

3.1.2 *Amplification de l'ADN par réaction en chaîne de la polymérase*

Suivant l'extraction de l'ADN génomique, des séquences cibles peuvent être amplifiées par une réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Cette méthode permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN connu à partir d'une faible quantité d'acide nucléique. L'enzyme qui permet la multiplication des séquences d'ADN cibles est la taq polymérase (10342.020 ; Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada). Le Tableau 12 contient les caractéristiques des amorces utilisées dans les réactions de PCR. La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. D'abord, la phase de dénaturation est effectuée à 94°C pendant 2 minutes. Ensuite, la phase d'hybridation ou d'appariement des amorces est effectuée à 61°C + 0.2°C/cycle pendant 2 minutes et 30 secondes. Finalement, la phase d'élongation est effectuée à 72°C pendant 6 minutes. Ces conditions sont répétées pour un total de 40 cycles. Les composantes de la

réaction sont décrites dans le Tableau 13. Les produits d'amplification sont migrés sur gel d'agarose 2% contenant 200X de SYBR Safe (S33102 ; Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada) afin de permettre la visualisation des amplicons.

Tableau 12 : Caractéristiques des amorces utilisées dans le géotypage des souris.

Amorce	Séquence de l'amorce	Direction	Longueur de l'amplicon (pbs)
mMCP-4 F	5' – CAA GGT CCA ACT AAC TCC CTT TGT GCT CC – 3'	WT Foward	-
mMCP-4 R	5' – GGT GAT CTC CAG ATG GGC CAT GTAAGG GCG – 3'	WT Reverse	900
mMCP-4 NEO	5' – GGG CCA GCT CAT TCC TCC CAC TCA TGA TCT – 3'	KO Reverse	380

Abréviations : pbs, paires de bases ; mMCP-4, protéase mastocytaire de type 4 ; WT, de type sauvage ; KO, *knock out*.

Tableau 13 : Produits utilisés et concentrations requises pour la réaction d'amplification.

Produits	Concentrations
Eau	-
Tampon 10X	1X
dNTPs (10 mM)	0.4 mM
MgCl ₂ (50 mM)	6 mM
Amorces (10 µM)	1 µM
ADNc	-
Taq (1U/µl)	0.04 U

Abréviations : dNTP, désoxyribonucléoside triphosphate ; ADNc, acide désoxyribonucléique circulaire

3.2 Isolation des mastocytes péritonéaux

Les souris reçoivent d'abord le traitement intrapéritonéal au véhicule, au C48/80 ou au cromolyn. La souris est ensuite anesthésiée avec une injection intramusculaire de kétamine : xylazine (Vetalar, Bioniche, Belleville, Ontario, Canada et Xylamax, Bimeda, Cambridge, Ontario, Canada) à une dose de 87 : 13 mg/kg puis euthanasiée par dislocation

cervicale. Les mastocytes sont ensuite isolés de la cavité péritonéale des souris comme décrit précédemment (Semaan *et al.*, 2015). Un bout de peau est retiré de l'abdomen et à l'aide d'une seringue de 1 mL montée d'une aiguille 25 G 5/8, une injection de 5 mL de tampon d'isolation, composé de 10 mM PBS pH 7.4 avec 1 mg/ml d'albumine sérique bovine (BSA) (A4503-10G ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) et 0.5 mg/ml d'héparine (C504801 ; Héparine LEO Pharma A/S, Ballerup, Danemark) est injecté dans le péritoine. Un massage abdominal d'environ 1 minute stimule le détachement des mastocytes intrapéritonéaux. Une petite incision effectuée dans le péritoine permet de récolter la solution contenant les mastocytes avec une pipette pasteur. Cette solution est centrifugée à une vitesse de 200 x g pendant 5 minutes, puis le surnageant est jeté. Le culot contenant les cellules est suspendu dans 1 mL de tampon RPMI-1640 (350-000-CL ; Multicell ; Wisent Inc., Saint-Bruno, Québec, Canada) additionné de 1 mg/mL de BSA et de 100 U/ml de pénicilline (450-201-EL ; Multicell ; Wisent Inc., Saint-Bruno, Québec, Canada). La solution est incubée à 37°C pendant 1h, puis les cellules non adhérentes à la boîte de pétri sont récoltées. La solution est centrifugée à une vitesse de 200 x g pendant 5 minutes, puis le surnageant est jeté. Le culot est suspendu dans 1 mL de tampon d'isolation et les mastocytes sont colorés avec une solution de bleu de toluidine (89640-5G ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) mélangée à une solution saturée de saponine (47036-50G-F ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) dans 50% d'éthanol et à de l'éthanol 95%. Une fois colorées, les cellules peuvent être comptées à l'aide d'un hématimètre selon la méthode de Moore et James (Moore et James, 1953). La solution contenant les mastocytes est centrifugée à une vitesse de 200 x g pendant 5 minutes, puis le surnageant est jeté. Le culot est reconstitué dans 10mM PBS pH 8.0 afin d'obtenir 1×10^4 cellules/mL. La solution de mastocytes purifiés est conservée à -80°C jusqu'aux essais enzymatiques.

3.3 Préparation des échantillons tissulaires

3.3.1 Prélèvement et homogénéisation des cœurs et poumons

Les souris reçoivent d'abord le traitement intrapéritonéal au véhicule, au C48/80 ou au cromolyn, puis la chymase a été extraite des tissus cardiaque et pulmonaire comme décrit

précédemment (Houde *et al.*, 2013). La souris est ensuite anesthésiée et euthanasiée par dislocation cervicale. Les organes sont délicatement prélevés. Afin d'éliminer l'excédent de sang, les organes sont plongés dans la saline 0.9% isotonique à 4°C puis ils sont éponnés à l'aide d'un papier absorbant. Les organes sont ensuite congelés à -80°C ou directement dans la glace sèche avant l'étape de l'homogénéisation. Ils sont homogénéisés à l'aide d'un potter en verre dans un volume de 2 x 200 µl de PBS pH 8.0 à 4°C pour le ventricule gauche, ou dans 2 x 400 µl pour les poumons. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 14 000 x g pendant 20 minutes à 4°C. La fraction soluble correspondante au surnageant est délicatement prélevée puis congelée à -80°C.

3.3.2 Dosage protéique

La concentration protéique de chaque échantillon de tissus est déterminée par la méthode de dosage de Bradford (Kruger, 1994). Une courbe standard de la γ -globuline bovine est réalisée avec des concentrations de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0624 et 0.03125 mg/ml, obtenues par dilution en série à partir d'une solution mère à 1.4 mg/ml. Sur une microplaque transparente de 96 puits, un volume de 10 µl de chaque dilution de la courbe standard ou de l'échantillon à doser (dilués 1 : 40) sont mis dans 200 µl de la solution de Bradford (BioRad, Hercules, Californie, États-Unis), préalablement diluée dans la saline 0.9% isotonique selon un ratio de 1 : 5 puis filtrée à l'aide d'un papier Wattman. Après 5 minutes d'incubation dans le réactif de Bradford, une lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, Californie, États-Unis). Avec les densités optiques des échantillons de la courbe standard en fonction de la concentration protéique en mg/ml, on obtient la courbe standard et la formule de celle-ci est utilisée pour calculer la concentration protéique des échantillons inconnus (Figure 10).

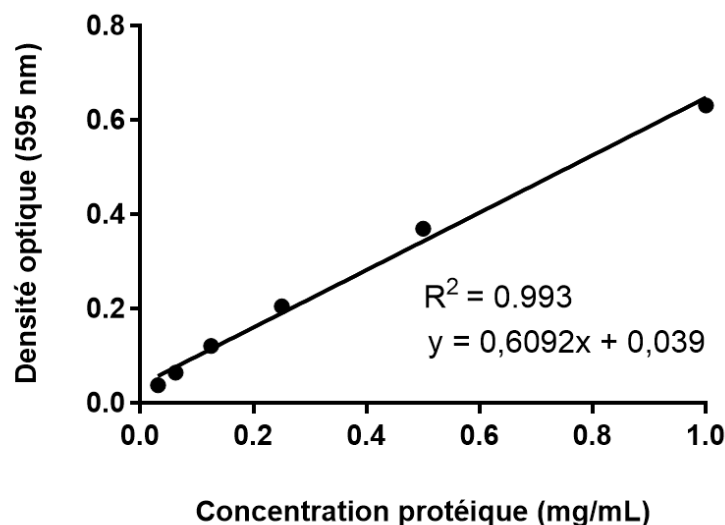


Figure 10 : Dosage protéique par la méthode de Bradford. Courbe standard de la densité optique des différentes concentrations de globulines sériques bovines avec la solution de Bradford.

3.4 Mesure de l'activité hydrolytique à l'aide d'un substrat fluorogénique

3.4.1 Essais enzymatiques avec mastocytes péritonéaux

Sur une microplaque opaque de 96 puits, un volume de 10 μ l de mastocytes solubilisés est ajouté à 90 μ l de 10 mM PBS pH 8.0. Une concentration de 10 μ M de TY-51469, un inhibiteur de chymase, peut être ajoutée dans les puits afin d'inhiber l'activité enzymatique de la chymase par les mastocytes (Semaan *et al.*, 2015). À l'aide d'une pipette répétitive Distriman (F164001 ; Gilson, Middleton, Wisconsin, États-Unis) montée d'un distritip 1250 μ l (F164110G ; Gilson, Middleton, Wisconsin, États-Unis), un volume de 20 μ l du substrat fluorogénique [Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC] est ajouté à chaque puit pour une concentration finale de 10 μ M. La lecture de fluorescence s'effectue dans le M1000 (TECAN, Research Triangle Park, NC, États-Unis) à une longueur d'onde d'excitation de 370 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm en faisant 2 lectures de fluorescence par minute pendant 20 minutes sans agitation. Les valeurs de fluorescence obtenues sont corrigées en fonction de l'échantillon « blanc » constitué de 100 μ l de 10 mM PBS pH 8.0 et 20 μ l de substrat fluorogénique.

3.4.2 *Essais enzymatiques avec homogénats de tissus*

À la suite du dosage par la méthode de Bradford, la fraction soluble des homogénats de poumons ou de ventricules gauches de souris WT et mMCP-4 KO sont dilués dans 10 mM PBS pH 8.0 afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/ml dans un volume total de 500 μ l. L'échantillon est incubé pendant 20 minutes à 37°C en prenant soin de vortexer toutes les 5 minutes. Dans certaines séries de résultats, l'homogénat est incubé avec 10 μ M de TY-51469, pendant 20 minutes à 37°C afin d'inhiber l'activité enzymatique dépendante de la chymase (Houde *et al.*, 2013). Un volume de 198 μ l d'échantillon est déposé dans une microplaque opaque de 96 puits et à l'aide d'une pipette répétitive, 2 μ l de substrat fluorogénique sont ajoutés à chaque puits pour une concentration finale de 10 μ M. La lecture de fluorescence s'effectue aux mêmes longueurs d'onde que les extraits de mastocytes purifiés. La lecture est réalisée sur 30 minutes en faisant 2 lectures de fluorescence par minute. Les valeurs de fluorescence obtenues sont corrigées en fonction de l'échantillon « blanc » constitué 198 μ l de PBS pH 8.0 et 2 μ l de substrat fluorogénique.

3.4.3 *Essais enzymatiques avec la chymase recombinante*

La mMCP-4 recombinante (rmMCP-4) est produite sous forme inactive et doit être activée selon le protocole décrit précédemment (Semaan *et al.*, 2015). La rmMCP-4 est d'abord diluée à une concentration de 20 mg/ml dans le tampon de maturation (50 mM d'acide 2-(N-morpholino) éthanosulfonique (MES), 0.1% de BSA, pH 5.5). La cathepsine C murine recombinante (2336-CY-010 ; R&D systems, Minneapolis, Minneapolis, États-Unis) est diluée à une concentration de 20 mg/ml dans un tampon contenant 50 mM de MES, 50 mM de chlorure de sodium (NaCl) (S271-3 ; Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) et 5 mM de DTT (BP172-5 ; Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) au pH 5.5. Une solution d'héparine (H3393-10KU ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) à 20 mg/ml est diluée à 1.5 mg/ml dans l'eau. Afin d'activer la rmMCP-4, 15 μ l de chymase diluée est combiné avec un volume de 15 μ l de cathepsine C diluée et 1 μ l d'héparine est ajouté et cette réaction est incubée pendant une heure à la température de la pièce. L'ajout de 1.98 μ l de N-éthylmaleimide (NEM) (E3876-5G ;

Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) à une concentration de 50 mM permet d'arrêter la réaction d'activation puis l'enzyme est diluée à une concentration finale de 2 µg/ml par l'ajout de 117 µl du tampon d'essais composé de 20 mM de Tris, 2 M de chlorure de potassium (KCl) (7447-40-7 ; Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) et 0.02% de Triton X100 (807426 ; JNC biomedical Inc., Aurora, Ohio, États-Unis) à pH 9.0. Une incubation de 5 minutes est nécessaire afin d'arrêter complètement la réaction. Le substrat fluorogénique [Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC] est dilué à une concentration de 200 µM dans le tampon d'essai. Un volume de 50 µl de chymase est déposé dans une microplaque opaque de 96 puits et à l'aide d'une pipette répétitive, 50 µl de substrat fluorogénique sont ajoutés à chaque puit pour une concentration finale de 100 µM. La lecture de fluorescence s'effectue pendant 30 minutes à une longueur d'onde de 370 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm en faisant 2 lectures de fluorescence par minute. Les valeurs de fluorescence obtenues sont corrigées en fonction de l'échantillon « blanc » constitué 50 µl de tampon d'essai et 50 µl de substrat fluorogénique.

3.5 Mesure de l'activité hydrolytique à l'aide d'un substrat colorimétrique

Un volume de 2.5 µl de mastocytes solubilisés est ajouté à un volume de 159.5 µl de 10 mM PBS pH 8.0 dans une microplaque transparente de 96 puits. À l'aide d'une pipette répétitive, un volume de 18 µl du substrat colorimétrique [RETF-4NA] est ajouté à chaque puits pour obtenir une concentration finale de 20 µM (Raymond *et al.*, 2009). Une lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 410 nm à l'aide du lecteur de microplaque SpectraMax en faisant 2 lectures de densité optique par minute pendant 3 heures. Les valeurs d'absorbance sont automatiquement corrigées en fonction de l'échantillon « blanc » constitué de PBS pH 8.0 et de 20 µM du substrat colorimétrique.

3.6 Étude *in vivo*

3.6.1 Chirurgie

La souris est d'abord anesthésiée avec une injection intramusculaire de kétamine : xylazine à une concentration de 87 : 13 mg/kg. Un morceau de peau d'environ 1 cm² au niveau du cou est retiré puis les glandes salivaires sont écartées afin permettre l'accès à la veine jugulaire et à l'artère carotide. Tout au long de la chirurgie et de l'enregistrement des paramètres hémodynamiques, la souris est disposée sous une lampe chauffante afin de maintenir une température ambiante d'environ 30 °C. La veine jugulaire est canulée avec un tube de polyéthylène PE10 (427401 ; Intramedic, Sparks Glencoe, Maryland, États-Unis) relié à une aiguille 30 G ½ sur une seringue de 1 mL contenant une solution saline 0.9% isotonique. L'artère carotide est canulée avec un tube de polyéthylène PE10 relié à une aiguille 30 G ½ sur une seringue de 1 mL contenant une solution saline 0.9% isotonique additionnée de 100 U/mL d'héparine afin d'empêcher la formation de thrombus dans la canule pouvant interférer avec la mesure des paramètres hémodynamiques. Avant la chirurgie et durant l'enregistrement des paramètres hémodynamiques, des doses de maintien équivalent au tiers de la dose de l'anesthésiant initialement administrée sont injectées par voie intramusculaire en fonction des réflexes de retrait de la patte de la souris lorsqu'une pression y est exercée à l'aide d'une pince.

3.6.2 Enregistrement et injections

La canule reliée à l'artère carotide est branchée à un transducteur de pression permettant de transmettre tous les paramètres hémodynamiques de la souris à un analyseur de pression sanguine (Digi-Med, Louisville, Kentucky, États-Unis) connecté à un ordinateur. Les données sont enregistrées à l'aide du logiciel DMSI-400 System Integrator (Digi-Med® System Integrator™, Louisville, Kentucky, États-Unis) qui permet de voir les paramètres en temps réel sur l'écran. À la suite du branchement, un temps de stabilisation de 15 minutes est nécessaire afin de permettre à l'animal de se remettre du stress engendré par la chirurgie. La lecture et l'enregistrement des paramètres hémodynamiques se poursuivent jusqu'à

30 minutes suivant l'injection intraveineuse des peptides vasopresseurs étudiés. Par la suite, les souris sont anesthésiées par dislocation cervicale.

3.6.3 Analyse des données

Les données de l'enregistrement sont importées sur Excel (suite Office ; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, États-Unis). La cinétique de la variation de la pression artérielle moyenne (Δ PAM) est effectuée avec les valeurs de pression artérielle moyenne (PAM) aux 30 secondes, soustraites par la pression de base, déterminée au moment de l'injection ($T=0$). La Δ PAM maximale est définie par la plus forte variation induite par l'administration des peptides exogènes dans les 30 minutes suivant l'injection intraveineuse.

3.7 Étude de la production d'ET-1 (1-31) par les mastocytes péritonéaux

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des protéines d'intérêt par leur masse moléculaire. Cette technique est basée sur la séparation et la détection d'ions fragmentés. Le spectre de masse des ions est mesuré en fonction du rapport masse sur la charge.

Contrairement aux essais enzymatiques, les mastocytes ne sont pas préalablement congelés à -80°C . Un volume correspondant à 9×10^5 mastocytes est incubé avec $1 \mu\text{M}$ de thirophan, un inhibiteur de la NEP pendant 20 minutes à 37°C . En parallèle, $1 \mu\text{M}$ de C48/80 ou $20 \mu\text{M}$ de cromolyn sont ajoutés. Suite au temps d'incubation requis pour l'un ou l'autre des agents, $15 \mu\text{M}$ de big-ET-1 sont ajoutés au milieu réactionnel. Suite à une incubation de 20 minutes à 37°C , une solution d'arrêt ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{DMSO}:\text{FA}$) est ajoutée afin d'inhiber la réaction enzymatique. Les solutions sont centrifugées à $200 \times g$ pendant 5 minutes puis le surnageant est analysé par spectrométrie de masse.

4 ÉTUDE DES PARAMÈTRES HÉMODYNAMIQUES CHEZ LA SOURIS ANESTHÉSIÉE

4.1 Protocoles expérimentaux

Le but de notre étude est de déterminer si un pré-traitement impliquant un activateur mastocytaire ou un stabilisateur mastocytaire influence les réponses hémodynamiques induites par les peptides vasopresseurs d'intérêt pour ce projet. Dans ce protocole, les souris reçoivent, au préalable, un pré-traitement par voie intrapéritonéale de C48/80 (1 mg/kg), de cromolyn (50 mg/kg), ou du véhicule utilisé pour la reconstitution de ses agents, une solution de 10 mM PBS à pH 7.4. Cette administration est suivie d'un temps d'incubation de 5 minutes pour le traitement au véhicule et au C48/80 ou de 30 minutes pour le traitement au cromolyn. Par la suite, les peptides pharmacologiques étudiés sont administrés en bolus de 30 µl par voie intraveineuse via la canule qui est reliée à la veine jugulaire. L'Ang I est administrée à des doses de 0.001, 0.01, 0.1 et 0.5 nmol/kg. Le [Pro¹¹, D-Ala¹²] Ang I, un analogue ECA-résistant de l'Ang I, est administré à une dose de 20 nmol/kg. L'ET-1 est administrée à une dose de 0.5 nmol/kg. L'ET-1 (1-31) est administrée à une dose de 1 nmol/kg. La big-ET-1 est administrée à des doses de 0.1, 0.5, 1 et 10 nmol/kg.

4.2 Justification des voies d'administration et des doses

L'administration des agents modulateurs de l'exocytose mastocytaire se fait par voie intrapéritonéale en raison de la présence d'une grande population de mastocytes matures des tissus conjonctifs à l'intérieur de la cavité péritonéale chez la souris (Malbec *et al.*, 2007). Ce type de mastocytes contient de la mMCP-4, l'enzyme qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de ce projet. Le choix des doses de C48/80 et de cromolyn est basé sur l'efficacité de ces agents à dégranuler ou stabiliser respectivement les mastocytes péritonéaux chez la souris. En effet, 1 mg/kg de C48/80 est suffisant pour induire la dégranulation des mastocytes en 5 minutes (Röhlich *et al.*, 1971). Également, plusieurs travaux ont montré que l'administration intrapéritonéale de 50 mg/kg de cromolyn permettait de diminuer l'hyperalgésie induite par des lésions nerveuses, d'inhiber les

mastocytes et de protéger contre les ulcères gastroduodénaux (Zuo *et al.*, 2003; Tariq *et al.*, 2006; Oka *et al.*, 2012). Dans les travaux de Skedinger *et al.* (1987), une incubation 30 minutes des cellules provoquait une inhibition optimale de l'influx de calcium nécessaire à l'activation mastocytaire. Les peptides vasopresseurs sont administrés par la veine jugulaire. Cette procédure permet l'administration de volumes plus importants, et ce, de manière moins invasive comparativement aux autres sites d'injection possible (veine caudale, veine fémorale) (Kakol Palm et Holländer, 2007). Ainsi, les agents peuvent rapidement atteindre la circulation pour se rendre aux organes sans risque d'administration périsvasculaire. La courbe dose-réponse de big-ET-1 a été reproduite selon Houde *et al.* (2013), où la dose seuil correspond à 0.01 nmol/kg et la dose correspondant à la réponse maximale est de 10 nmol/kg. Les doses d'ET-1 (1-31) (1 nmol/kg) et d'ET-1 (0.5 nmol/kg) ont été choisies afin d'obtenir une réponse vasopressive similaire une dose médiane de big-ET-1. Une courbe dose-réponse de l'Ang I a été effectuée à des doses allant de 0.001 à 0.5 nmol/kg, jusqu'à l'atteinte de la réponse maximale, soit environ 30-35 mmHg. Une concentration de 20 nmol/kg de [Pro¹¹, D-Ala¹²] Ang I permet d'obtenir une réponse pressive de 30 mmHg (D'Orléans-Juste *et al.*, 2008).

5 ANALYSES STATISTIQUES

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne et d'erreur standard sur la moyenne (SEM). Les valeurs de probabilité (p-value) obtenues par le test *t* de Student inférieures à 0.05 sont considérées comme étant significatives. Les analyses statistiques ont été calculées en utilisant GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, Californie, États-Unis).

6 ÉTHIQUE ANIMALE

L'ensemble des conditions environnementales et expérimentales sur les souris sont approuvées par le Comité éthique sur la recherche animale de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke et sont conformes aux guides énoncés par le Conseil canadien de protection des animaux.

RÉSULTATS

1 CONFIRMATION DU GÉNOTYPAGE DES SOURIS

Le génotypage a pour but de confirmer la présence ou l'absence d'un gène dans l'ADN purifié à partir de bouts de queue de souris conservés à -80 °C. Les séquences d'amorces s'hybrident sur le gène d'intérêt, *mMCP-4*, et permettent son amplification *in vitro*. Comme le montre la Figure 11, lors de la migration sur gel d'agarose, une bande dont la taille est de 900 paires de bases (pbs) correspondant au gène sauvage est présente dans les échantillons de souris WT. Cette bande n'est pas visible dans les échantillons de souris mMCP-4 KO. L'amorce dite « neo » va permettre l'amplification du gène muté et produira une bande de 380 pbs. Le génotype des souris utilisées pour les séries de résultats est validé.

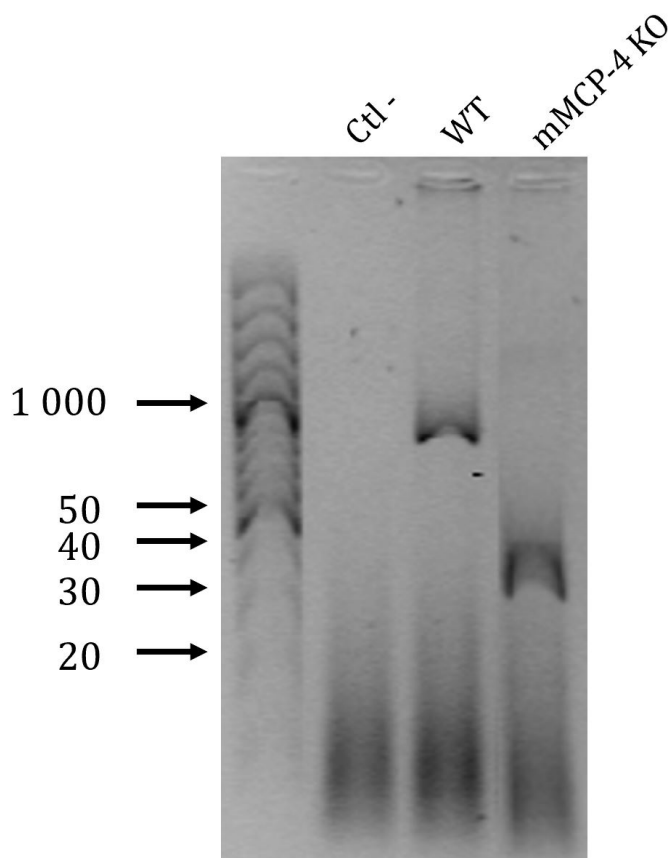


Figure 11 : Amplification des gènes par PCR. Validation du génotypage d'une souris WT et mMCP-4 KO pour le gène *mMCP-4* (Ctl - = contrôle négatif sans ADNc).

2 ÉTUDE DES MASTOCYTES PÉRITONÉAUX

2.1 Isolation et décompte des mastocytes péritonéaux

À la suite du lavage péritonéal, les mastocytes présents dans la cavité ont été isolés puis dénombrés à l'aide d'un hématimètre et d'un colorant, le bleu de toluidine, qui permet la coloration des granules mastocytaires. Nous avons d'abord comparé les décomptes mastocytaires chez les souris WT et mMCP-4 KO dans le but de vérifier l'impact d'une répression génique du gène de la mMCP-4 sur la densité mastocytaire au niveau du péritoine chez la souris. Les colonnes blanches présentées dans la Figure 12 montrent le dénombrement des mastocytes sans traitement chez les deux types de souris. On observe un nombre de mastocytes péritonéaux significativement plus élevé chez la souris mMCP-4 KO en comparaison avec le nombre de mastocytes isolés chez les souris WT.

2.2 Effet du C48/80 et du cromolyn sur la viabilité cellulaire

D'autre part, l'objectif principal de l'étude était de démontrer l'influence de la modulation de l'exocytose mastocytaire sur les propriétés pharmacologiques de la mMCP-4 *in vitro* et *in vivo*. Nous avons d'abord vérifié l'impact de l'administration par voie intrapéritonéale d'agents modulateurs (C48/80 et cromolyn) sur le décompte mastocytaire. Cette analyse permet d'assurer que les effets de l'un ou l'autre des agents n'interfèrent pas avec la viabilité ou le décompte cellulaire. L'isolation et le décompte mastocytaire ont été effectués suivant le temps d'incubation requis pour chacun des agents (C48/80 = 5 minutes, cromolyn = 30 minutes). Comme le démontre la Figure 12, l'administration de C48/80 ou de cromolyn n'interfèrent pas avec le décompte ou la viabilité mastocytaire lorsqu'on compare avec le décompte des mastocytes dérivés de souris WT et mMCP-4 KO saines.

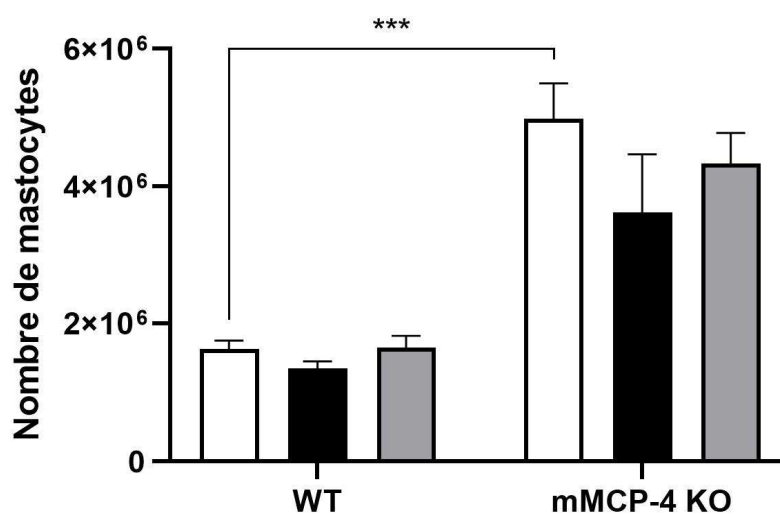


Figure 12 : Décompte mastocytaire chez les souris WT et mMCP-4 KO. Décompte des mastocytes suite à la pré-administration intrapéritonéale du véhicule (□), du C48/80 (■) ou du cromolyn (▒) chez les souris WT et mMCP-4 KO. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes. *** $p < 0.001$ comparé au WT + véhicule.

2.3 Activité enzymatique mMCP-4-dépendante des mastocytes péritonéaux

L'activité enzymatique de type chymotrypsine dans les mastocytes isolés de souris WT et mMCP-4 KO a été évaluée. Nous avons utilisé un substrat fluorogénique couplé à l'AMC (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amino-4-méthyl coumarin) pouvant être clivé par l'activité chymotrypsine de la mMCP-4. Ainsi, suite au clivage hydrolytique en aval de la phénylalanine, le composé fluorophore libéré émet une fluorescence mesurable par spectrophotométrie. L'augmentation temps-dépendant de la fluorescence, exprimée en unités arbitraires de fluorescence (UAF) indique la présence d'une activité enzymatique de type chymotrypsine chez la population de mastocytes.

Suite à l'ajout de 10 μ M de substrat fluorogénique, nous avons observé, à la Figure 13 (A), une fluorescence significativement diminuée chez les mastocytes péritonéaux issus de souris mMCP-4 KO, après 20 minutes d'incubation à 37°C.

Cependant, plusieurs protéases présentes dans les granules mastocytaires, tel que la cathepsine G, la trypsine, et la chymotrypsine possèdent une activité enzymatique de type chymotrypsine (Wintroub *et al.*, 1986). Afin de confirmer que le clivage du substrat est spécifique à l'action protéolytique de la mMCP-4, nous avons effectué le même protocole expérimental, cette fois-ci en utilisant un substrat colorimétrique chymase-spécifique, le RETF-4NA. La Figure 13 (B) présente les valeurs d'absorbance maximale obtenues après 3 heures d'incubation à 37°C. Nous observons une absorbance significativement plus élevée dans les mastocytes issus de souris WT. Cette activité est supprimée dans les mastocytes mMCP-4 KO, confirmant ainsi une absence totale d'activité enzymatique chymase-spécifique dans les mastocytes déficients en mMCP-4.

Finalement, dans la Figure 13 (C), en présence de 10 μ M de TY-51469, un inhibiteur de la chymase, on observe une inhibition complète de l'activité enzymatique chez les mastocytes WT. Ce résultat nous permet d'affirmer, encore une fois, que l'activité enzymatique observée dans les mastocytes péritonéaux est bien celle de la mMCP-4.

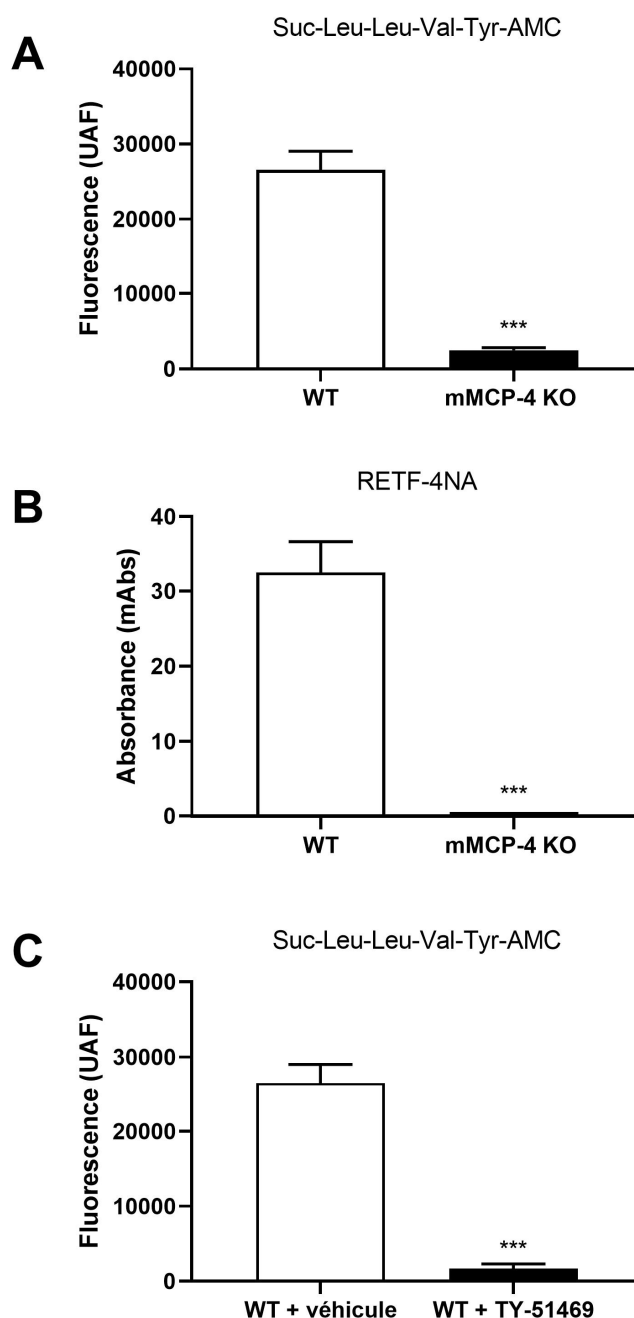


Figure 13 : Activité enzymatique dans les mastocytes péritonéaux. Quantification de l'activité enzymatique des mastocytes péritonéaux de souris WT et mMCP-4 KO à l'aide (A) d'un substrat fluorogénique chymotrypsine-spécifique [Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC] et (B) d'un substrat colorimétrique chymase-spécifique [RETF-4NA]. (C) Quantification de l'activité enzymatique des mastocytes péritonéaux de souris WT en absence ou en présence de TY-51469. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 4 expériences indépendantes. *** $p < 0.001$ comparé au WT ou WT + véhicule.

2.4 Effet du C48/80 et du cromolyn sur l'activité enzymatique des mastocytes

Nous avons ensuite vérifié l'impact d'une activation ou d'une stabilisation des mastocytes sur le contenu granulaire en mMCP-4. Nous avons mesuré l'activité enzymatique de type chymotrypsine dans les mastocytes péritonéaux suivant la pré-administration par voie intrapéritonéale de C48/80 ou de cromolyn, attribuable à un effet chronique des agents. La Figure 14 présente les profils de cinétique de l'activité de la mMCP-4 chez les mastocytes WT (Figure 14A) et mMCP-4 KO (Figure 14B). En premier lieu, chez les mastocytes dérivés de souris WT, on observe une fluorescence significativement plus élevée suivant le traitement au cromolyn, indiquant un plus grand contenu en mMCP-4 chez le mastocyte stabilisé. À l'opposé, on observe une faible hydrolyse du substrat suivant l'administration de C48/80, montrant que l'agent sécrétagogue déplete le mastocyte de son contenu en mMCP-4. Tel qu'attendu, la pré-administration de C48/80 ou de cromolyn n'a pas eu d'effet sur le profil de cinétique enzymatique chez les mastocytes où le gène exprimant la mMCP-4 a été réprimé.

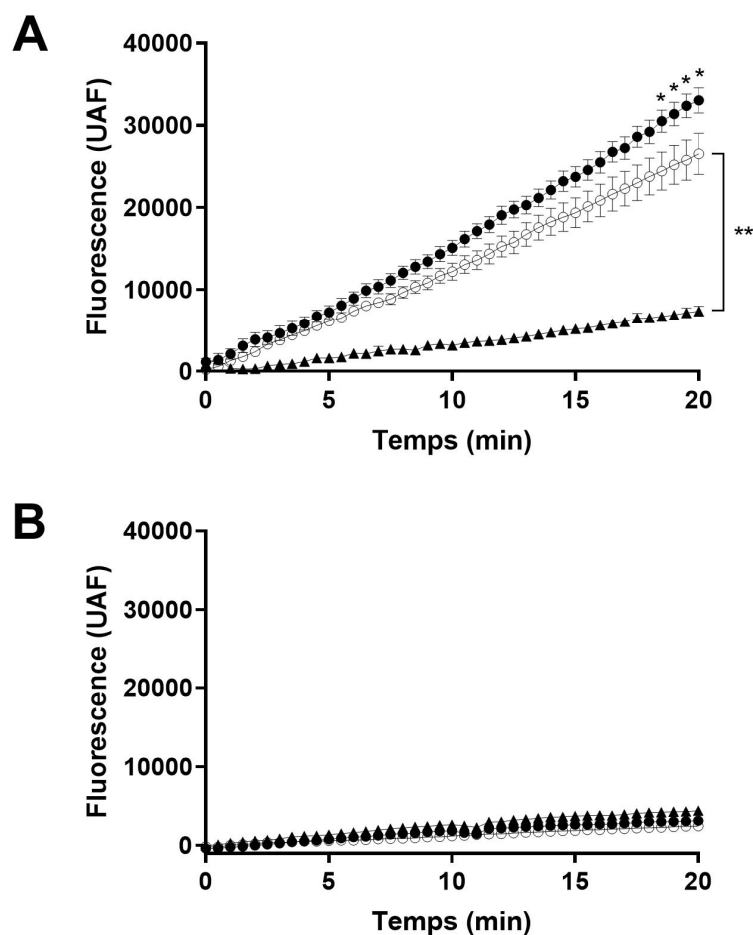


Figure 14 : Activité enzymatique dans les mastocytes péritonéaux prétraités au C48/80 et au cromolyn. Cinétique d'activité enzymatique de type chymotrypsine avec des mastocytes intrapéritonéaux prétraités avec le véhicule (\circ), le C48/80 (\blacktriangle) ou le cromolyn (\bullet) à l'aide d'un substrat fluorogénique [Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC] chez les souris (A) WT et (B) mMCP-4 KO. Chaque point représente la moyenne \pm SEM d'au moins 5 expériences indépendantes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparé au WT + véhicule.

3 ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DANS LES TISSUS

3.1 Effet du C48/80, du cromolyn et du TY-51469 sur l'activité chymotrypsine dans les homogénats de tissus pulmonaires

Suivant l'administration par voie intrapéritonéale de C48/80 ou de cromolyn, nous avons vérifié si ces agents pouvaient moduler le contenu en mMCP-4 chez les mastocytes résidents des tissulaires pulmonaires. En premier lieu, dans la Figure 15 (A), chez les souris WT, nous observons une diminution significative de l'activité enzymatique de type chymotrypsine dans les fractions solubles d'homogénats de poumons dérivés de souris ayant reçu un prétraitement intrapéritonéal au C48/80. Toutefois, contrairement à ce que l'on observe chez les mastocytes péritonéaux, il n'y a aucune variation significative dans les cinétiques de la fluorescence dans les organes dérivés de souris ayant reçu un prétraitement au cromolyn par rapport au contrôle ($p=0,1494$ cromolyn vs véhicule chez la souris WT). Nous observons, dans les Figures 15 (B) et (C), qu'aucun des prétraitements n'a provoqué de variation dans les cinétiques de fluorescence dans les poumons mMCP-4 KO, mais également dans les poumons de souris WT où la chymase a été inhibée le TY-51469.

3.2 Effet du C48/80 et du cromolyn sur l'activité chymotrypsine dans les homogénats de ventricule gauche

Nous avons effectué des essais enzymatiques avec les surnageants provenant de tissus ventriculaires gauches issus de souris WT et mMCP-4 KO prétraitées avec le C48/80 ou le cromolyn. Dans la Figure 16, nous observons qu'il n'y a aucune variation dans les cinétiques de fluorescence en fonction du prétraitement à l'un ou l'autre des agents chez les deux types de souris, mais également aucune variation significative dans les fluorescences maximales atteintes après 20 minutes d'incubation à 37°C avec le substrat fluorogénique dans toutes les conditions. Ces résultats suggèrent une faible activité mMCP-4-dépendante au niveau des mastocytes des tissus cardiaques chez la souris.

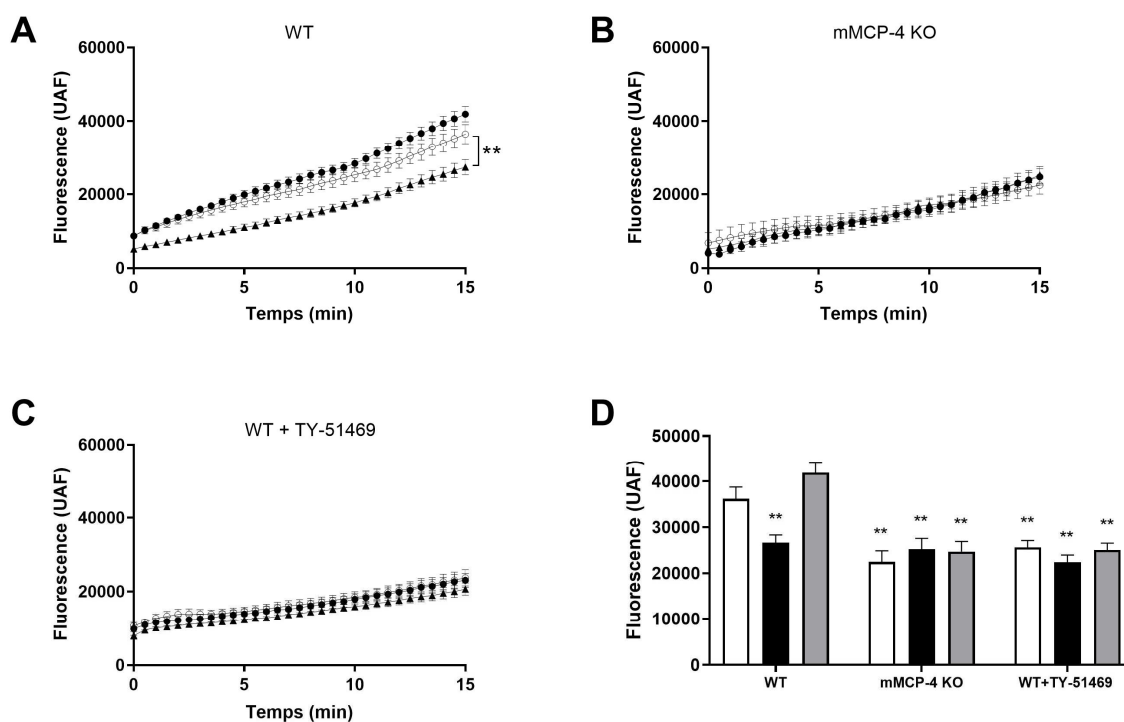


Figure 15 : Effet du C48/80 et du cromolyn sur l'activité enzymatique dans les tissus pulmonaires en absence ou en présence de TY-51469. Cinétique d'activité enzymatique de type chymotrypsine dans les surnageants de tissus pulmonaires dérivés (A) de souris WT, (B) de souris mMCP-4 KO et (C) de souris WT en présence de 10 μ M de TY-51469 prétraitées par voie intrapéritonéale avec le véhicule (\circ), le C48/80 (\blacktriangle) ou le cromolyn (\bullet) à l'aide d'un substrat fluorogénique [Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC]. (D) Valeur maximale de fluorescence maximale après 15 minutes dans toutes les conditions (véhicule (\square), C48/80 (\blacksquare) et cromolyn (\blacksquare)). Chaque point ou colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes. ** $p < 0.01$ comparé au WT + véhicule.

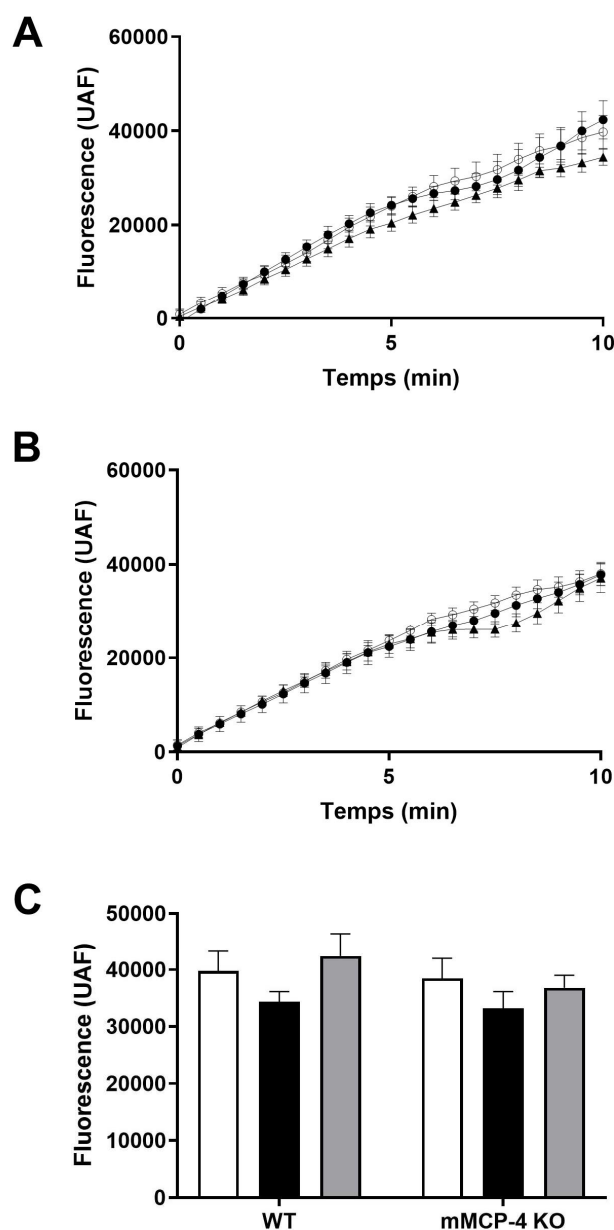


Figure 16 : Effet du C48/80 et du cromolyn sur l'activité enzymatique dans les tissus ventriculaires gauches. Cinétique d'activité enzymatique de type chymotrypsine dans les surnageants de ventricule gauche dérivé (A) de souris WT et (B) de souris mMCP-4 KO prétraitées par voie intrapéritonéale avec le véhicule (○), le C48/80 (▲) ou le cromolyn (●) à l'aide d'un substrat fluorogénique [Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC]. (D) Valeur maximale de fluorescence après 10 minutes dans toutes les conditions (véhicule (□), C48/80 (■) et cromolyn (▣)). Chaque point ou colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 4 expériences indépendantes.

4 ÉTUDE DE SPÉCIFICITÉ

Afin d'exclure toutes interactions possibles entre les prétraitements administrés aux mastocytes péritonéaux et les propriétés physicochimiques de la chymase, nous avons effectué des essais enzymatiques avec la rmMCP-4 en présence de C48/80 et de cromolyn. Les concentrations de 12 μ M de C48/80 et de 600 μ M de cromolyn ont été choisies afin d'imiter les concentrations des agents qui seront administrés chez la souris anesthésiée *in vivo*. Après 30 minutes d'incubation à 37°C en présence de 100 μ M de substrat fluorogénique, à la Figure 17, nous n'observons aucun effet significatif du C48/80 ou du cromolyn sur la variation maximale de fluorescence. En guise de contrôle négatif, nous avons également incubé la rmMCP-4 avec 10 μ M de TY-51469. L'inhibition complète de l'activité chymase par le TY-51469 nous permet d'affirmer que l'enzyme recombinant possède les mêmes propriétés enzymatiques que la mMCP-4 mastocytaire.

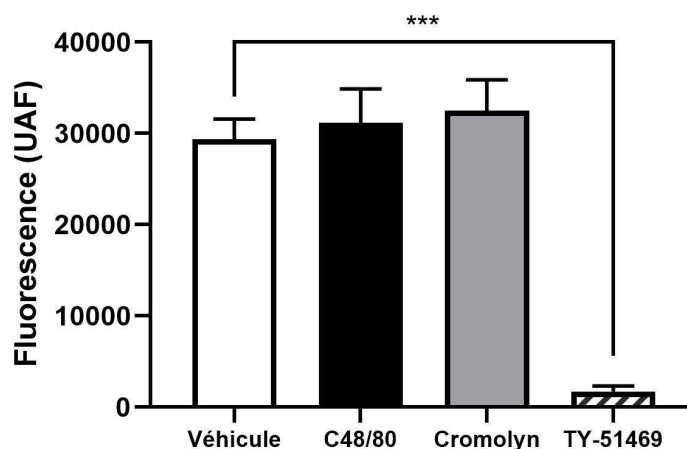


Figure 17 : Étude de l'interaction possible entre le C48/80, le cromolyn et le TY-51469 et l'activité enzymatique de la rmMCP-4. Quantification de l'activité enzymatique de la rmMCP-4 en présence du véhicule, de C48/80, de cromolyn et de TY-51469 à l'aide d'un substrat fluorogénique [Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC]. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes. *** $p < 0.001$ comparé au véhicule.

5 PRODUCTION *IN VITRO* D'ET-1 (1-31) PAR DES MASTOCYTES PÉRITONÉAUX

Par une approche en spectrométrie de masse, nous avons étudié l'impact direct (comparable à une administration aigüe) du C48/80 et du cromolyn sur la conversion mMCP-4-dépendante de la big-ET-1 en ET-1 (1-31). Dans un milieu réactionnel contenant une population de mastocytes WT ou mMCP-4 KO intacts, nous avons ajouté une concentration de 1 μ M de C48/80 ou 20 μ M de cromolyn. Nous avons effectué une incubation de la big-ET-1 (1 μ M) pendant 20 minutes à 37°C. La Figure 18 illustre les quantités relatives d'ET-1 (1-31) produite mesurées en fonction de l'aire sous la courbe (ASC) du spectre correspondant au peptide d'intérêt. Tout d'abord, chez les mastocytes WT, on observe une augmentation significative de la production mMCP-4-dépendante de l'ET-1 (1-31) en présence de C48/80. Au contraire, la stabilisation des mastocytes par le cromolyn a supprimé cette production. Chez la souris mMCP-4, aucune conversion de la big-ET-1 en d'ET-1 (1-31) n'a eu lieu, en absence ou en présence du dégranulateur des mastocytes. Ces résultats suggèrent que l'état de stabilité des mastocytes pourrait jouer un rôle essentiel dans la conversion de la big-ET-1 en ET-1 (1-31) *in vitro*, et que celle-ci est uniquement médiée par la mMCP-4.

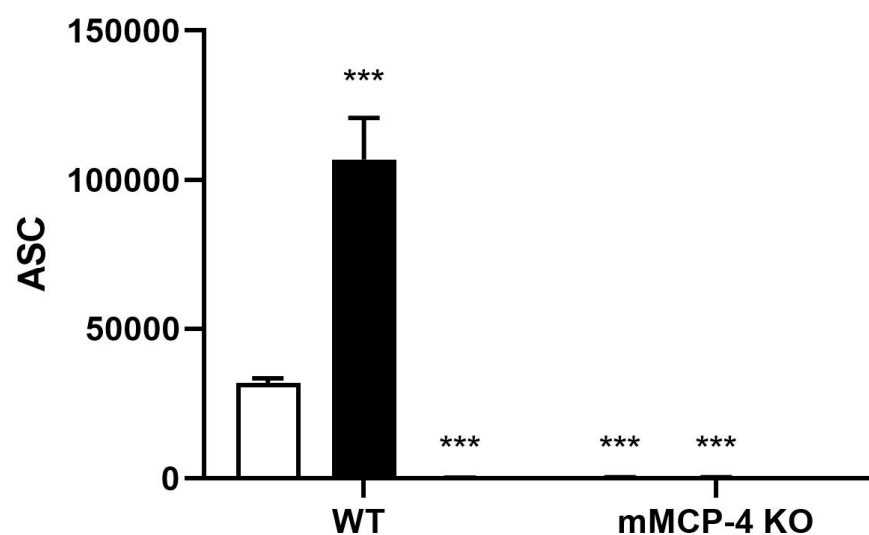


Figure 18 : Conversion de la big-ET-1 en ET-1 (1-31) par des mastocytes péritonéaux. Mesure de la quantité relative d'ET-1 (1-31) exprimée selon l'aire sous la courbe (ASC) à partir de la big-ET-1 (15 μ M) par des mastocytes WT et mMCP-4 en présence du véhicule (□), du C48/80 (■) ou du cromolyn (▒). Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 4 expériences indépendantes. *** $p < 0.001$ comparé au WT + véhicule.

6 ÉTUDE DES PARAMÈTRES HÉMODYNAMIQUES CHEZ LA SOURIS ANESTHÉSIÉE

6.1 Étude de la réponse pressive à l'injection de big-ET-1

Notre équipe de recherche a précédemment montré l'importance de la voie alternative impliquant la mMCP-4 dans la maturation de la big-ET-1 en ET-1. Nous avons montré que cette voie était responsable d'environ 40% des propriétés vasopressives issues de la production d'ET-1 à partir du précurseur (Houde *et al.*, 2013). La mMCP-4 étant exclusivement présente au niveau des mastocytes, nous nous sommes intéressés à étudier l'influence de l'état de stabilité des mastocytes sur cette voie métabolique.

6.1.1 Effets opposés du C48/80 et du cromolyn sur la courbe dose-réponse de la big-ET-1

La Figure 19 présente les courbes dose-réponses de la variation maximale de la PAM suivant l'injection de doses croissantes de big-ET-1 (0.1 à 10 nmol/kg) chez les souris WT et mMCP-4 KO ayant reçu un prétraitement au dégranulateur ou au stabilisateur mastocytaire. En premier lieu, la Figure 19 (A) montre que chez la souris WT, la stabilisation des mastocytes par le cromolyn atténue la réponse pressive à la big-ET-1, tandis que cette réponse est potentiée par la dégranulation mastocytaire induite par le C48/80. En deuxième lieu, à la Figure 19 (B), on observe que ces agents modulateurs n'influencent pas la courbe dose-réponse chez la souris mMCP-4 KO. Fait intéressant, l'analyse de la dose efficace médiane (ED50) nous permet de visualiser un déplacement de la courbe vers la droite pour le cromolyn (cromolyn = 1.052 nmol/kg vs véhicule = 0.895 nmol/kg), et un déplacement vers la gauche pour le C48/80 (C48/80 = 0.759 nmol/kg). Chez les souris mMCP-4, ces valeurs d'ED50 ne varient pas (véhicule = 1.150 nmol/kg, C48/80 = 1.184 et Cromolyn = 1.175 nmol/kg). Les Figures 20 et 21 ont été ajoutées afin de permettre la visualisation, respectivement, des valeurs maximales de l'augmentation de la PAM en fonction des doses étudiées, mais également des profils de la cinétique de cette réponse pressive chez les souris WT et mMCP-4 KO.

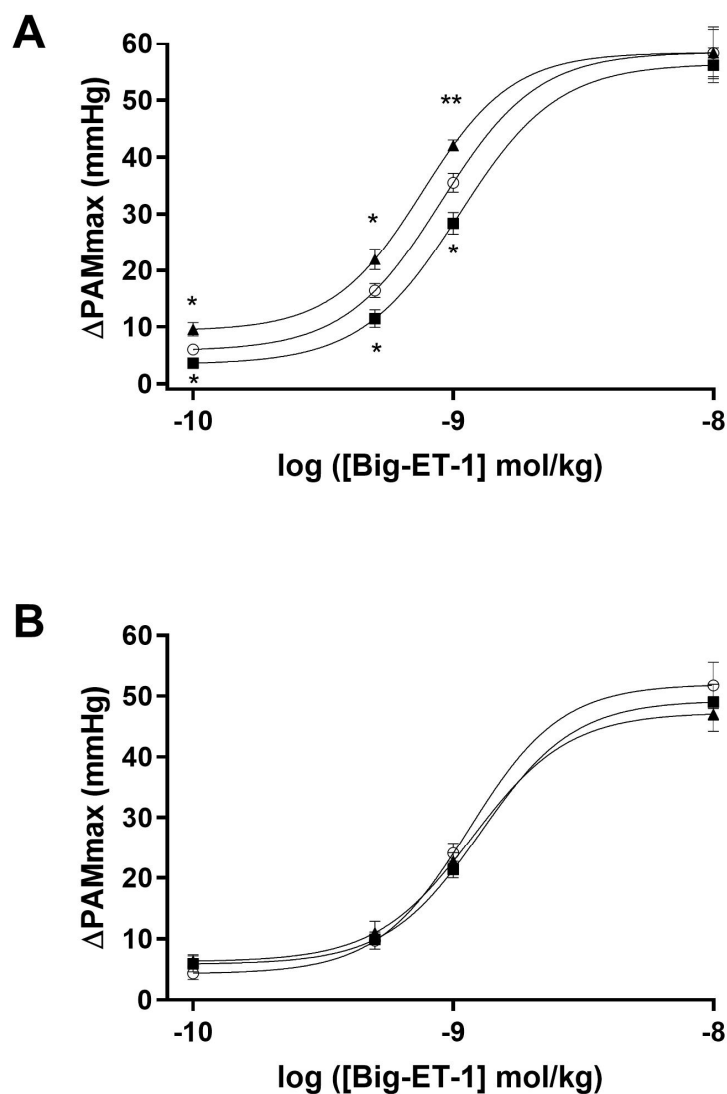


Figure 19 : Effet du C48/80 et du cromolyn sur les courbes doses-réponses à la big-ET-1. Courbe dose-réponse de la variation maximale de la PAM suivant l'injection par voie intraveineuse de big-ET-1 (0.1 à 10 nmol/kg) chez la souris (A) WT et (B) mMCP-4 KO prétraitées par voie intrapéritonéale avec le véhicule (○), le C48/80 (▲) ou le cromolyn (●). Chaque point représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparé au véhicule.

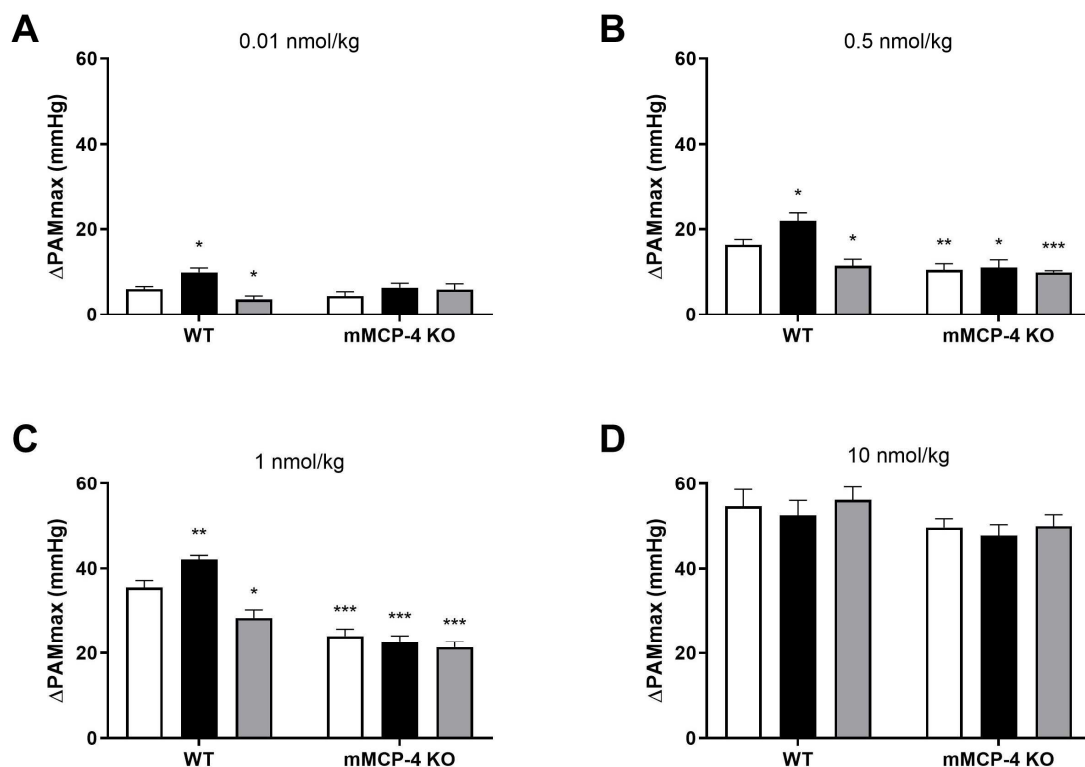


Figure 20 : Réponse pressive à l'injection de la big-ET-1. Comparaison de la valeur maximale de la ΔPAM chez les souris WT et mMCP-4 KO prétraitées par voie intrapéritonéale avec le véhicule (□), le C48/80 (■) ou le cromolyn (▒) suite à l'injection de (A) 0.1, (B) 0.5, (C) 1, et (D) 10 nmol/kg de big-ET-1. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 comparé au WT + véhicule.

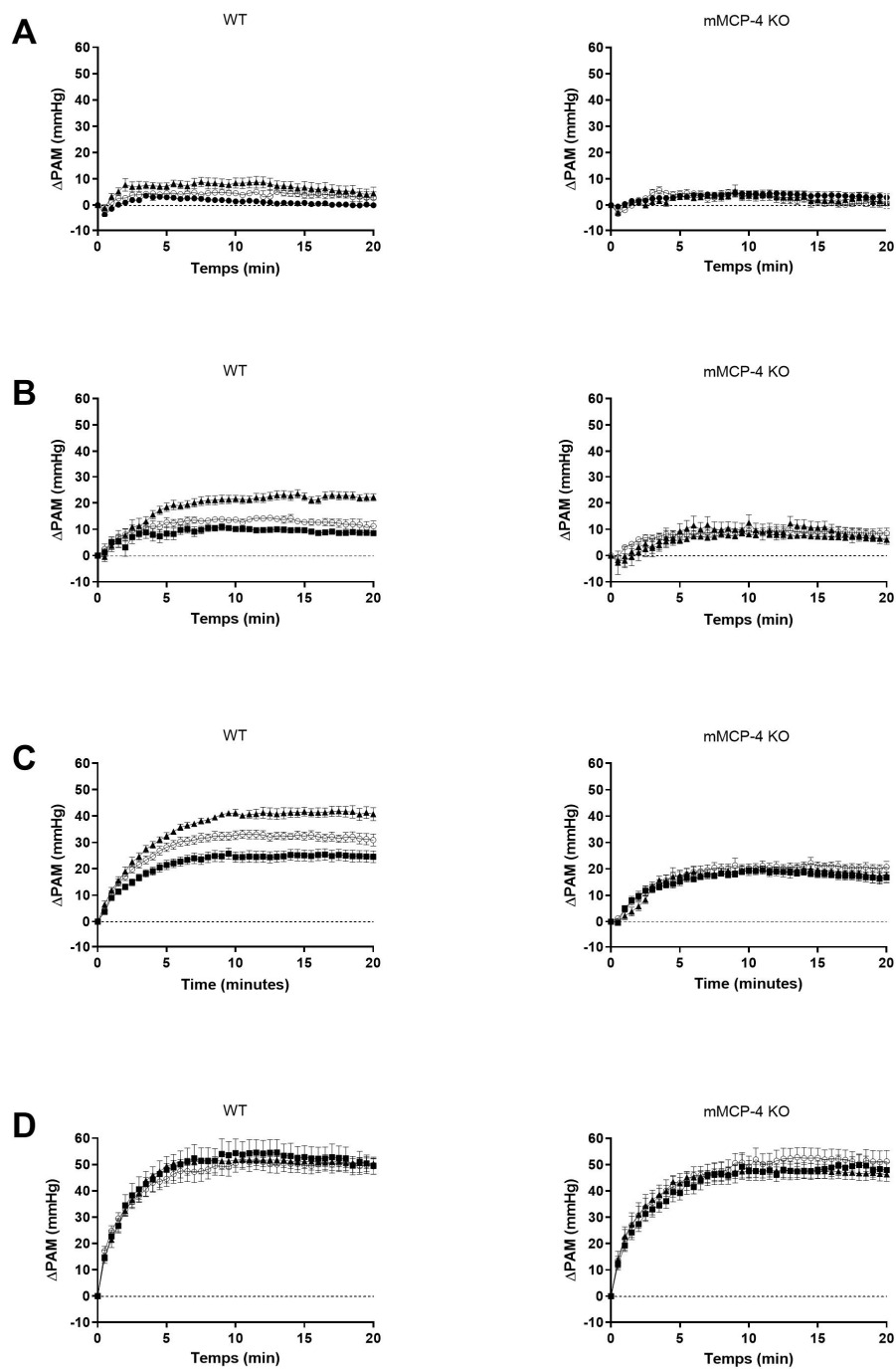


Figure 21 : Profil hémodynamique à l'injection de la big-ET-1. Profil de cinétique de l'augmentation de la PAM suite à l'injection de (A) 0.1, (B) 0.5, (C) 1 et (D) 10 nmol/kg de big-ET-1 chez les souris WT (gauche) et mMCP-4 KO (droite) prétraitées par voie intrapéritonéale au véhicule (○), au C48/80 (▲) ou au cromolyn (●). Chaque point représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes.

6.1.2 *Étude de la réponse pressive à l'injection des produits de métabolisme de la big-ET-1*

La big-ET-1 est un métabolite inactif et doit être métabolisé par l'ECE ou par les actions consécutives de la chymase et de la NEP afin de produire ses effets presseurs médiés par l'ET-1 *in vivo*. Afin de nous assurer que la modulation de la réponse biologique observée précédemment est due spécifiquement à la contribution de la mMCP-4 dans le métabolisme de la big-ET-1, nous avons vérifié la réponse biologique aux produits de métabolisme de ce dernier, soit l'ET-1 (1-31) et l'ET-1.

Les Figures 22 (A) et (B) présentent les cinétiques de la réponse pressive induite par l'ET-1 (1-31) (1 nmol/kg) chez la souris WT et mMCP-4 respectivement. Ces souris ont préalablement reçu une injection par voie intrapéritonéale de C48/80 ou de cromolyn. On remarque que l'activation ou la stabilisation des mastocytes n'induisent aucune variation dans la cinétique de pression artérielle suivant l'injection par voie intraveineuse d'ET-1 (1-31) chez les deux types de souris. Également, l'absence de différence significative dans les valeurs maximales de l'augmentation de la PAM présentées dans la Figure 22 (C) montre que les réponses pressives induites par l'ET-1 ne sont pas modulées par la dégranulation mastocytaire.

Le même protocole expérimental a été effectué avec l'ET-1. Les Figures 23 (A) et (B) présentent les cinétiques de la réponse pressive induite par l'ET-1 (0.5 nmol/kg) chez la souris WT et mMCP-4 respectivement. Les valeurs maximales de l'augmentation de la pression artérielle sont présentées dans la Figure 23 (C). Encore une fois, aucune variation significative n'a été observée dans les cinétiques de PAM et les valeurs maximales en fonction de l'état de stabilité des mastocytes.

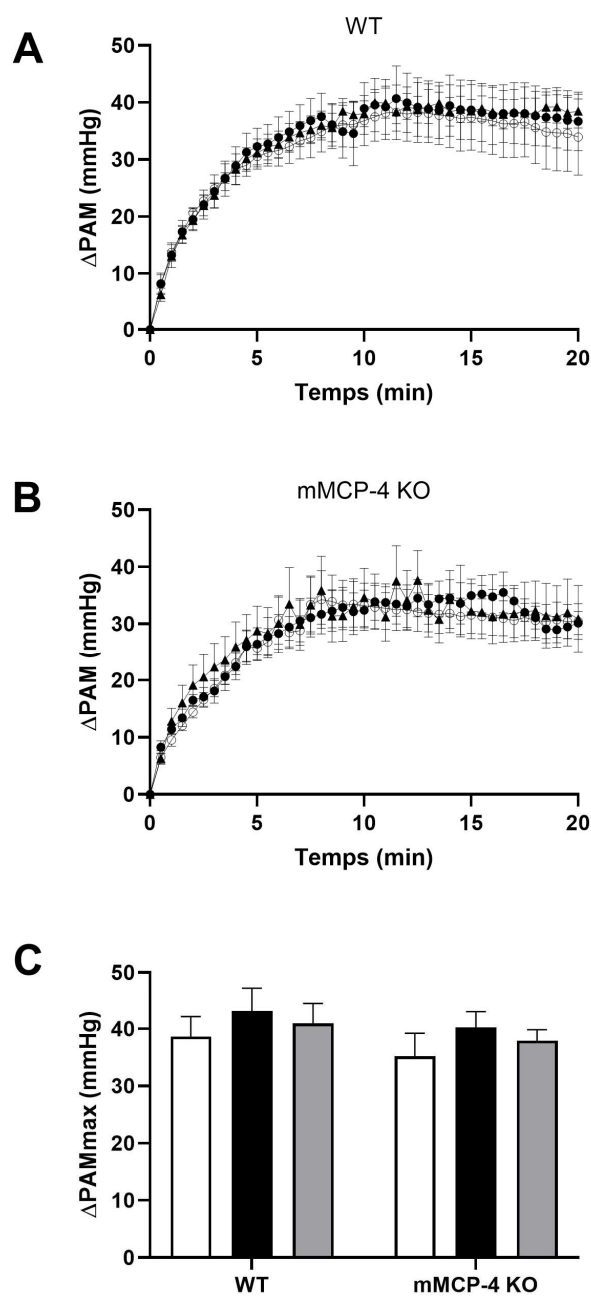


Figure 22 : Réponse pressive à l'injection d'ET-1 (1-31). Profil de cinétique de l'augmentation de la PAM suite à l'injection d'ET-1 (1-31) (1 nmol/kg) chez les souris (A) WT et (B) mMCP-4 KO prétraitées par voie intrapéritonéale au véhicule (○), au C48/80 (▲). (C) Comparaison de la valeur maximale de la ΔPAM dans toutes les conditions (véhicule (□), C48/80 (■) et cromolyn (▣)). Chaque point ou colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 4 expériences indépendantes.

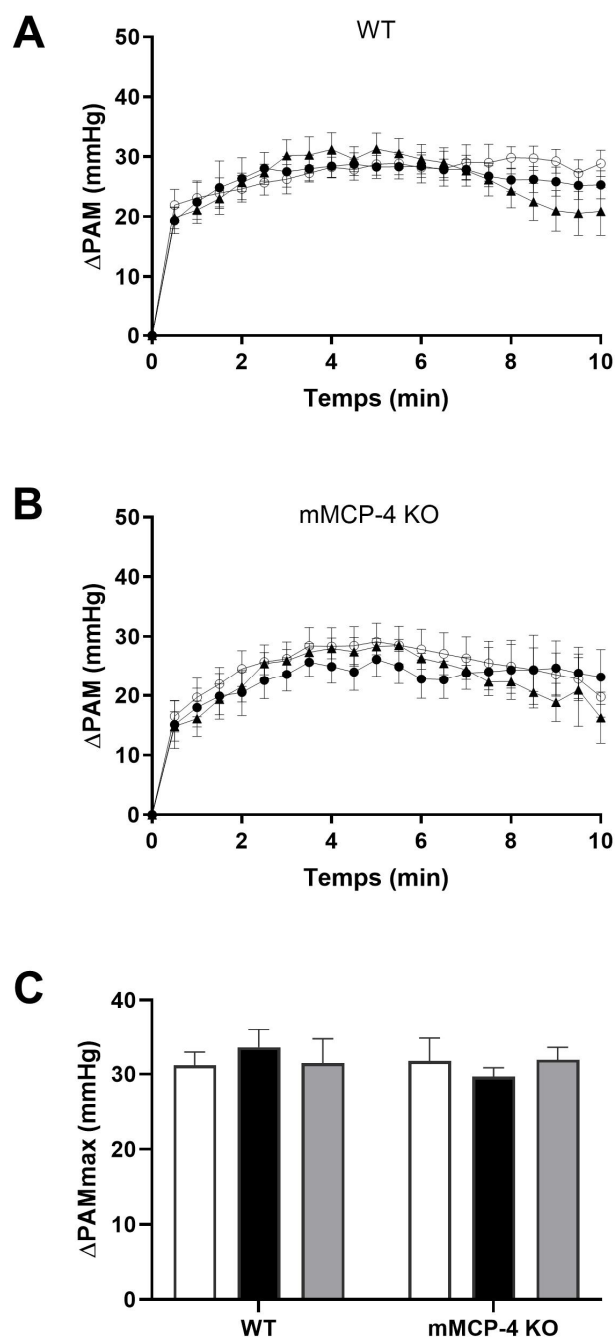


Figure 23 : Réponse pressive à l'injection d'ET-1. Profil de cinétique de l'augmentation de la PAM suivant l'injection d'ET-1 (0.5 nmol/kg) chez les souris (A) WT (B) et mMCP-4 KO prétraitées par voie intrapéritonéale avec le véhicule (○), le C48/80 (▲) ou le cromolyn (●). (C) Comparaison de la valeur maximale de la ΔPAM dans toutes les conditions (véhicule (□), C48/80 (■) et cromolyn (▢)). Chaque point ou colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes.

6.1.3 Effets du TY-51469 sur la réponse hémodynamique à la big-ET-1

La Figure 24 illustre les cinétiques de la réponse pressive et les valeurs maximales de l'augmentation de la PAM suivant l'injection de la big-ET-1 à une dose médiane de la courbe dose-réponse (1 nmol/kg) chez la souris WT en présence d'un inhibiteur de la chymase, le TY-51469 (10 mg/kg). On observe, dans la Figure 24, que le TY-51469 supprime la contribution de la mMCP-4 dans la réponse biologique de la big-ET-1 chez la souris WT. Les cinétiques de l'augmentation de la PAM ainsi que les valeurs de pression maximale sont similaires, indépendamment de l'induction de la dégranulation ou de la stabilisation mastocytaire. Ces résultats suggèrent que la mMCP-4 est impliquée dans les réponses pressives suivant l'injection de la big-ET-1 exogène chez la souris WT.

Notons que le même protocole expérimental a été effectué chez la souris mMCP-4 KO. Tel qu'attendu, l'administration d'un inhibiteur de la chymase n'a eu d'impact significatif ni dans les cinétiques de PAM, ni dans les réponses maximales (résultat non illustré).

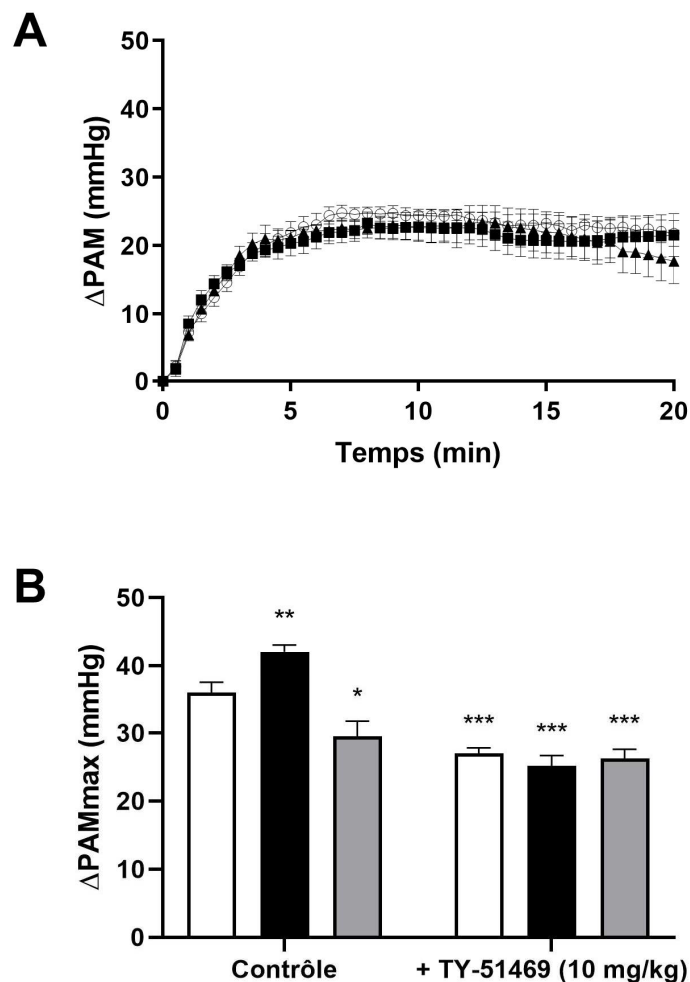


Figure 24 : Contribution de la chymase dans la réponse pressive à la big-ET-1. (A) Effet du TY-51469 (10 mg/kg) sur la cinétique de PAM suivant l'injection de big-ET-1 (1 nmol/kg) chez la souris WT prétraitée par voie intrapéritonéale avec le véhicule (○), le C48/80 (▲) ou le cromolyn (●). (B) Comparaison de la valeur maximale de la ΔPAM dans toutes les conditions (véhicule (□), C48/80 (■) et cromolyn (▤)). Chaque point ou colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparé au WT + véhicule.

6.2 Étude de la réponse pressive à l'injection d'Ang I

Plusieurs équipes de recherche ont démontré que la mMCP-4 catalyse la transformation de l'Ang I en Ang II *in vitro* (Caughey *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 2003; Kunori *et al.*, 2005). De plus, l'administration chronique d'un inhibiteur de l'ECA ne supprime pas complètement les niveaux d'Ang II dans le liquide interstitiel du ventricule gauche, suggérant que la chymase joue un rôle dans cette réaction (Wei *et al.*, 2010). Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés au rôle de la mMCP-4 dans la voie de métabolisme de l'Ang I chez la souris.

6.2.1 Courbe dose-réponse à l'Ang I

Afin d'étudier la contribution de la mMCP-4 dans la réponse pressive à l'Ang I, nous avons effectué une courbe dose-réponse chez la souris WT et mMCP-4 KO. La Figure 25 présente la réponse biologique induite par des doses croissantes d'Ang I (0.001 à 1 nmol/kg) chez les deux types de souris. À noter qu'une dose supérieure à 1 nmol/kg provoquait des tachycardies chez l'animal. On remarque que les courbes dose-réponses chez la souris WT et mMCP-4 KO ont toutes les deux des profils similaires.

6.2.2 Effet du TY-51469 sur la réponse pressive à l'injection d'Ang I

Suite à l'absence de variation significative observée dans les réponses pressives suivant l'injection d'Ang I chez les souris WT et mMCP-4 KO, nous avons effectué un second test utilisant un inhibiteur de la chymase afin de valider l'absence d'une contribution de la mMCP-4 dans cette réponse hémodynamique. Nous avons étudié l'augmentation de la PAM suivant l'injection de l'Ang I à une dose médiane (0.01 nmol/kg) chez la souris WT en présence de TY-51469 (10 mg/kg). Nous n'avons observé aucune variation significative dans les valeurs maximales chez les deux types de souris, en présence ou en absence de TY-51469, suggérant que la mMCP-4 n'est pas impliquée dans la réponse biologique de Ang I chez la souris (résultat non illustré).

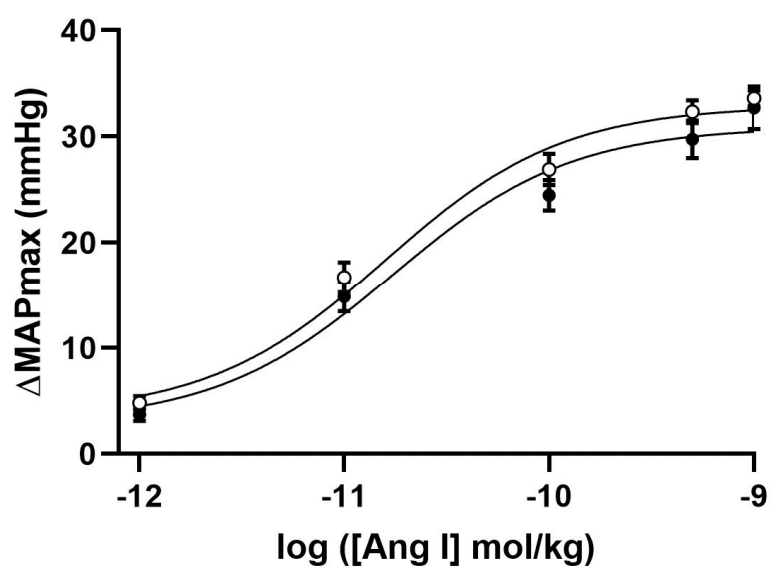


Figure 25 : Courbes doses-réponse à l'Ang I. Courbe dose-réponse de la variation maximale de la PAM suivant l'injection par voie intraveineuse d'Ang I (0.001 à 1 nmol/kg) chez les souris de type sauvage (\circ) et mMCP-4 KO (\bullet). Chaque point ou colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes.

6.2.3 Effet du C48/80 et du cromolyn sur la réponse pressive à l'injection d'Ang I

Nous avons voulu voir l'impact d'une modulation de l'exocytose sur la réponse biologique à l'Ang I chez la souris WT et mMCP-4 KO. Tel que montré dans les Figures 26 (A) et (B), représentant les cinétiques de la Δ PAM induite par l'Ang I chez la souris WT et mMCP-4 KO respectivement, l'état dégranulation des mastocytes n'a pas provoqué d'impact sur la réponse vasopressive à l'Ang I chez les deux types de souris. La Figure 26 (C) montre que les valeurs maximales de l'augmentation de la pression sont similaires dans chacune des conditions. Également, un histogramme représentant les ASC permet une visualisation plus précise de la cinétique de la PAM dans le temps, montrant que la réponse pressive à l'Ang I n'est pas influencée par l'état de stabilité mastocytaire (Figure 26 (D)).

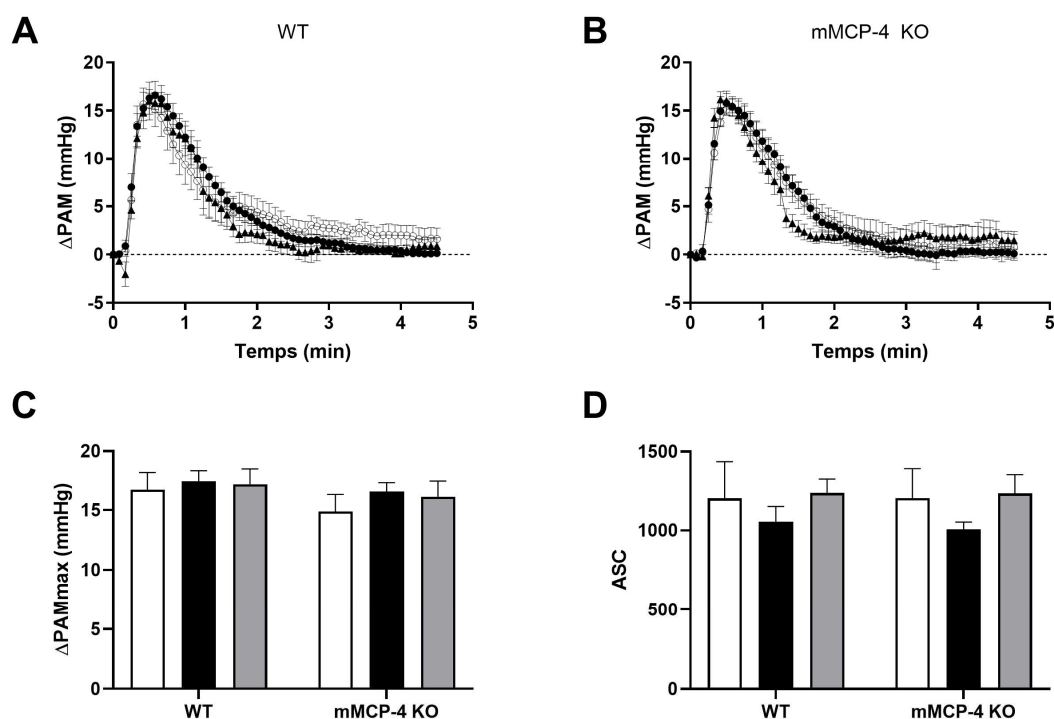


Figure 26 : Effet du C48/80 et du cromolyn sur la réponse pressive à l'Ang I. Profil de cinétique de l'augmentation de la PAM suivant l'injection d'Ang I (0.01 nmol/kg) chez les souris (A) WT (B) et mMCP-4 KO prétraitées par voie intrapéritonéale avec le véhicule (○), le C48/80 (▲) ou le cromolyn (●). Comparaison (C) de la valeur maximale de la Δ PAM et (D) de l'ASC dans toutes les conditions (véhicule (□), C48/80 (■) et cromolyn (▣)). Chaque point ou colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 5 expériences indépendantes.

6.2.4 Étude de la réponse pressive à un analogue ECA-résistant de l'Ang I

Afin de montrer la contribution de la chymase dans la production d'Ang II, des études ont fait intervenir un analogue résistant à l'ECA, le [Pro¹¹, D-Ala¹²] Ang I. Les propriétés vasopressives de cet analogue ont permis de démontrer le rôle de la chymase dans la conversion ECA-indépendante de l'Ang I en Ang II (Nishimura *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004). Notre laboratoire a également démontré l'effet presseur de cet analogue chez la souris de type sauvage, en présence ou en absence d'un inhibiteur des ECA, le captopril (D'Orléans-Juste *et al.*, 2008). L'absence de différence significative dans les réponses pressives induites par l'analogue en présence ou non de captopril ont permis de montrer que cette réponse n'était pas médiée par les ECA, mais bien par une voie métabolique alternative de la production d'Ang II (D'Orléans-Juste *et al.*, 2008).

Nous avons vérifié les propriétés vasopressives de cet analogue ECA-résistant chez les souris WT et les souris dont la mMCP-4 a été réprimée. Comme démontré dans la Figure 27 (A), nous avons observé une augmentation de la PAM suivant l'injection du [Pro¹¹, D-Ala¹²] Ang I chez la souris mMCP-4 KO. Les valeurs maximales de l'augmentation de la PAM suivant l'injection de cet analogue sont similaires chez deux types de souris, tel que montré dans la Figure 27 (B). Par ailleurs, les ASC présentées à la Figure 27 (C), illustrent une réponse plus prolongée chez la souris de type sauvage comparativement à la souris mMCP-4 KO, ce qui suggère une contribution de la mMCP-4 dans la prolongation de la réponse pressive induite par l'analogue ECA-résistant.

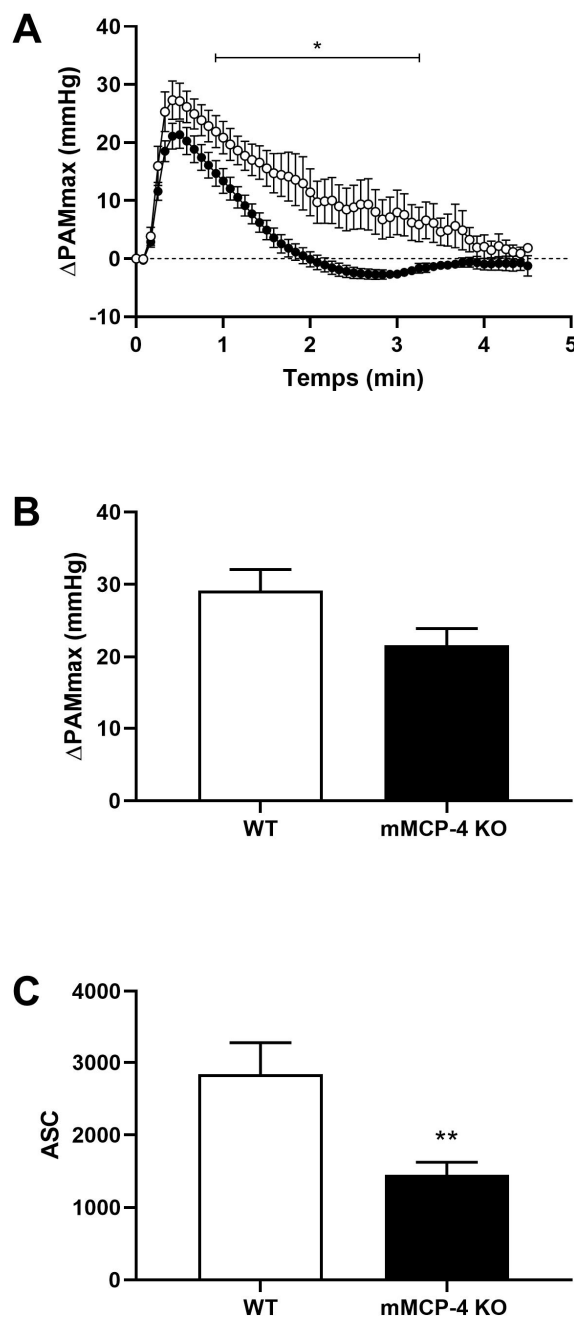


Figure 27 : Réponse pressive à l'injection de [Pro¹¹, D-Ala¹²] Ang I. Profil de cinétique de l'augmentation de la PAM suivant l'injection de l'analogue ECA-résistant (20 nmol/kg) chez les souris (A) WT (○) et mMCP-4 KO (●). Analyse (B) de la valeur maximale de l'augmentation de la PAM et (C) de l'ASC. Chaque point ou colonne représente la moyenne \pm SEM d'au moins 6 expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparé au WT.

DISCUSSION

Les études que nous avons réalisées démontrent l'influence mastocytaire sur le système endothélinergique dans un modèle de souris *in vivo*. La chymase étant exclusivement présente à l'intérieur des granules sécrétoires des mastocytes, nous avons émis l'hypothèse que l'activation ou la stabilisation mastocytaire modulaient les réponses pressives médiées par la production d'ET-1 à partir de son précurseur, la big-ET-1. Pour ce faire, nous avons utilisé la souris comme modèle expérimental. La comparaison avec un modèle de souris réprimée pour la mMCP-4 nous a permis d'associer l'ensemble des effets observés à une contribution spécifique de cet isoforme de la chymase.

La chymase joue également un rôle significatif au niveau du système rénine-angiotensine, notamment dans la génération d'Ang II cardiaque, chez l'humain (Urata *et al.*, 1990b). Cependant, la contribution de l'isoforme mMCP-4 dans ce système chez la souris est encore peu étudiée à ce jour. Nos travaux ont été réalisés dans le but, d'une part, d'évaluer la contribution de mMCP-4 dans la réponse vasopressive issue de la production d'ET-1 ou d'Ang II, et d'autre part, de montrer l'influence de l'état de stabilité mastocytaire sur la modulation de cette réponse aux deux précurseurs.

1 RÉSUMÉ DES RÉSULTATS ET VALIDATION DE L'HYPOTHÈSE

Nous avons démontré que l'activation mastocytaire *in vitro* par le C48/80 provoquait la relâche de la mMCP-4 par les mastocytes et induisait l'augmentation de l'hydrolyse de la big-ET-1 en ET-1 (1-31). Dans nos études *in vivo*, nous avons observé que l'activation mastocytaire engendrait une réponse hémodynamique significativement augmentée et prolongée suivant l'injection de big-ET-1 chez la souris anesthésiée. En revanche, la stabilisation des mastocytes par le cromolyn a permis aux mastocytes de conserver leur contenu en mMCP-4, et de supprimer la production d'ET-1 (1-31) *in vitro*. Le cromolyn a également atténué la réponse pressive à la big-ET-1. Fait intéressant, ce mécanisme dépendant de l'exocytose mastocytaire n'a pas été observé dans nos travaux effectués avec un second substrat connu de la mMCP-4, l'Ang I (Semaan *et al.*, 2015). Cette dernière étude

avait montré que la répression génique de la mMCP-4 n'entraînait aucun effet significatif sur la réponse pressive à l'Ang I exogène. Nos résultats suggèrent donc un rôle dynamique plus important de la mMCP-4 dans la génération d'ET-1 que d'Ang II dans un modèle de souris *in vivo*.

Nous avons émis l'hypothèse que l'état de dégranulation mastocytaire influence la réponse vasopressive mMCP-4-spécifique de la big-ET-1 chez la souris anesthésiée. Les travaux présentés dans ce mémoire permettent de postuler que la variation de la réponse biologique suivant l'injection de big-ET-1 est médiée par une modulation de la production mMCP-4-dépendante d'ET-1 (1-31) à partir du précurseur, qui favorise, par la suite, une production plus importante et rapide d'ET-1 par la NEP.

2 ORIGINALITÉ DE LA PRÉSENTE ÉTUDE

Les études effectuées précédemment dans le laboratoire ont montré l'importance de la chymase dans la production ECE-indépendante de l'ET-1 chez la souris (Fecteau *et al.*, 2005; Simard *et al.*, 2009; Houde *et al.*, 2013). Cependant, la chymase étant exclusivement présente au niveau des granules des mastocytes, l'activité biologique de celle-ci serait, par conséquent, dépendante de sa sécrétion. La contribution de la chymase sur la réponse biologique induite par la big-ET-1 ou l'Ang I en conditions particulières d'activation ou de stabilisation des mastocytes n'a pas été rapportée dans la littérature à ce jour. L'originalité de notre recherche se présente donc sous deux aspects. D'abord, nous avons utilisé un modèle *in vivo* d'activation et de stabilisation des mastocytes en utilisant des agents pouvant moduler leurs activités sécrétoires. Nous avons ensuite démontré l'impact de cette modulation de l'exocytose sur les effets biologiques de la big-ET-1 et de l'Ang I exogènes, deux substrats connus de la mMCP-4.

3 VALIDATION DES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

3.1 Impact de la répression génique de la mMCP-4 au niveau des mastocytes péritonéaux et chez la souris *in vivo*

Des études antérieures ont démontré que le contenu granulaire reflète un processus dynamique dans lequel la répression génique d'un constituant peut affecter le stockage des autres composantes, le nombre et la morphologie des mastocytes (Forsberg *et al.*, 1999; Humphries *et al.*, 1999). Tel que décrit dans les travaux de Tchougounova *et al.* (2003), les souris dont le gène exprimant la mMCP-4 a été réprimé sont viables et fertiles. Dans cette étude, l'absence de la mMCP-4 n'a pas eu d'impact sur la présence et la concentration d'autres protéases des CTMC (mMCP-5, -6 et carboxypeptidase A). Aussi, l'inactivation de la mMCP-4 n'a entraîné aucun effet sur la taille, le nombre ou la morphologie apparente des mastocytes, et ceux-ci réagissaient normalement aux agents sécrétagogues tels que le C48/80 ou la substance P.

Comme dans l'étude de Tchougounova *et al.* (2003), la répression génique de la mMCP-4 n'a provoqué, dans notre étude, aucune caractéristique phénotypique particulière, à l'exception toutefois d'un nombre de mastocytes significativement plus élevé dans la région péritonéale des souris mMCP-4 KO, et ce, en désaccord avec la littérature précédemment citée. Il est possible que l'augmentation significative des mastocytes observée dans notre modèle de souris mMCP-4 KO soit attribuable à un phénomène compensatoire engendré par la perte d'un constituant des granules mastocytaires. En effet, certaines études ont montré que des mutations génétiques pouvaient entraîner des changements dans le nombre de mastocytes. Par exemple, Dudeck *et al.* (2011) ont rapporté que la perte du gène de la mMCP-5 provoque une forte diminution du nombre de mastocytes au niveau du péritoine et, au contraire, Sulcova *et al.* (2015) ont démontré que la répression du gène codant pour le récepteur 2 des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF-2) engendre une augmentation significative du nombre de mastocytes chez la souris.

Néanmoins, l'augmentation significative du nombre de mastocytes chez les souris réprimées pour la mMCP-4 n'a induit aucun effet significatif au niveau des systèmes étudiés (endothélinergique et angiotensinergique) dans le cadre des travaux présentés dans ce

mémoire. De plus, l'utilisation d'un modèle *in vivo* réprimé pour une seule enzyme mastocytaire nous permet d'attribuer un effet spécifique à un mécanisme mMCP-4-dépendant, et de valider qu'aucune autre protéase mastocytaire n'est impliquée dans les réponses vasopressives de la big-ET-1.

3.2 Analyse de spécificité du C48/80 et du cromolyn

Le C48/80 se retrouve généralement soit sous forme monomérique ou, homo-polymérique (c'est-à-dire, composé de plusieurs sous-unités répétées). La proportion de ces conformations monomériques et polymériques peut modifier les propriétés pharmacologiques de ce sécrétagogue et induire des liaisons non-spécifiques avec d'autres protéines ou récepteurs membranaires (Palomäki et Laitinen, 2006). Également, bien que le traitement au cromolyn soit pratique courante dans l'étude du rôle des mastocytes dans des modèles de souris (Samoszuk et Corwin 2003; Bot *et al.* 2007; Liu *et al.* 2009; Liao *et al.* 2010), peu de publications confirment que le cromolyn cible spécifiquement les mastocytes. De plus, aucune évidence ne permet de définir dans quelle mesure le cromolyn peut limiter la fonction des mastocytes de souris ou influencer les processus biologiques indépendamment des effets sur ce type cellulaire. En effet, le cromolyn est un composé anionique pouvant interférer avec des récepteurs, en particulier les RCPG (Klinker et Seifert, 1997), et interagir avec des protéines (Dakhel *et al.*, 2014). Ainsi, l'utilisation de l'un ou l'autre de ces agents peut éventuellement causer une modification de l'activité hydrolytique de la mMCP-4 ou provoquer des effets cardiovasculaires via une liaison non-spécifique à un récepteur.

Toutefois, dans nos essais, l'absence d'interaction physicochimique des agents (C48/80 ou cromolyn) sur l'activité enzymatique de la mMCP-4 recombinante a permis d'exclure la possibilité d'une modulation des propriétés enzymatiques de cet isoforme de la chymase sur ses substrats. De plus, l'analyse des décomptes mastocytaires suite à l'induction de l'activation ou de la stabilisation mastocytaire confirme que les effets observés dans nos essais *in vivo* ne sont pas engendrés par une modulation du nombre de mastocytes viables. Ainsi, dans le cadre de nos travaux, l'utilisation du C48/80 et du cromolyn semble favorable

dans l'étude de l'impact de l'exocytose mastocytaire sur les propriétés biochimiques de la mMCP-4 chez la souris.

4 RÔLE DE L'EXOCYTOSE MASTOCYTAIRE DANS LA RÉPONSE À LA BIG-ET-1 *IN VIVO*

4.1 Activation mastocytaire

Le C48/80 est un agent sécrétagogue pouvant induire l'activation non-immunologique (c'est-à-dire indépendante des IgE) des mastocytes. D'une part, le C48/80 peut être administré de manière aiguë dans le but d'étudier l'effet direct d'une dégranulation mastocytaire ou de manière chronique afin de dépléter pharmacologiquement le mastocyte de son contenu granulaire. Le C48/80 induit la dégranulation des mastocytes via la stimulation du récepteur MRGPRB2 (Gaudenzio, 2018). Celui-ci est exprimé à la surface des CTMC (mastocytes chymase+), ce qui rend ce sous-type de mastocytes susceptible à la dégranulation par le C48/80. Les MMC (mastocytes chymase-) n'expriment pas ce récepteur et sont donc insensibles à la dégranulation par le C48/80 (McNeil *et al.*, 2015).

Nous avons induit la sécrétion de la mMCP-4 mastocytaire par l'administration de C48/80 chez la souris. Nous avons observé une forte réduction de l'activité enzymatique dépendante de la chymase chez les mastocytes péritonéaux, suivant l'administration de C48/80, confirmant que cet agent induit la dégranulation mastocytaire et la sécrétion de chymase active chez la souris.

L'administration intrapéritonéale de C48/80 entraîne également la dégranulation des mastocytes résidents des tissus pulmonaires. En revanche, contrairement aux mastocytes péritonéaux, majoritairement composés de CTMC, les tissus pulmonaires sont riches en MMC (Welle, 1997), contribuant ainsi à la fluorescence intrinsèque dans les homogénats d'organe dérivées de souris tant WT que mMCP-4 KO. Cette fluorescence indépendante de la chymase provient d'autres protéases mastocytaires ayant une activité enzymatique de type chymotrypsine (trypsine, cathepsine G, chymotrypsine (Wintroub *et al.*, 1986)) responsable du clivage du substrat fluorogénique. Cette activité enzymatique de type chymotrypsine est

observée dans les organes dérivés de souris n'exprimant pas la mMCP-4 ou dans les organes WT en présence d'un inhibiteur de la chymase, le TY-51469 (Houde *et al.*, 2013).

Au niveau des tissus ventriculaires gauches, l'activation des mastocytes n'entraîne pas de perte d'activité enzymatique dépendante de la mMCP-4, suggérant la présence d'une faible population de mastocytes positifs pour la chymase. Ce dernier résultat est en accord avec la littérature qui rapporte une très faible activité chymase au niveau du tissu cardiaque chez la souris (Balcells *et al.*, 1997).

L'effet direct du sécrétagogue sur la capacité des mastocytes à générer de l'ET-1 (1-31) *in vitro* a été confirmé dans la présente étude. Nous avons montré une augmentation significative de la conversion de la big-ET-1 exogène en ET-1 (1-31), suggérant que l'activation des mastocytes libère la mMCP-4 active dans le milieu extracellulaire et permet l'hydrolyse des substrats. L'inhibition totale la conversion de la big-ET-1 en d'ET-1 (1-31) par les mastocytes mMCP-4 KO activés montre que la mMCP-4 est la seule enzyme mastocytaire pouvant produire ce peptide de 31 acides aminés, ce qui est en accord avec la littérature (Semaan *et al.*, 2015). L'activation des mastocytes avec le C48/80 a aussi potenté la réponse pressive à la big-ET-1 chez la souris. L'inhibition de la chymase par le TY-51469 a par ailleurs produit le même effet que la délétion de la mMCP-4 dans les souris WT, illustrant que la mMCP-4 est responsable de cette potentiation de la réponse biologique de la big-ET-1 *in vivo*.

Il est important de noter que l'activité endogène de la NEP est nécessaire pour que l'ET-1 (1-31) produite par la chymase puisse exercer ses effets presseurs *in vivo* (Fecteau *et al.*, 2005). Des résultats antérieurs à la présente étude ont rapporté que la répression de la mMCP-4 ne change pas l'expression des récepteurs endothélinergiques ou de la NEP dans le système vasculaire de la souris (Houde *et al.*, 2013). L'administration d'ET-1 (1-31) et d'ET-1 a produit la même réponse hémodynamique dans les deux types de souris, avant et après induction de la dégranulation mastocytaire, illustrant que la chymase n'est pas responsable des effets biologiques de ces deux métabolites. L'ensemble de ces résultats suggère qu'un état de dégranulation mastocytaire favoriserait une plus grande génération d'ET-1 via la voie métabolique chymase/NEP.

La détermination des constantes de cinétique de la mMCP-4 contre la big-ET-1 et l'Ang I comme substrats ont fait l'objet de récentes publications de notre laboratoire.

La mMCP-4 possède une affinité et une efficacité de clivage supérieures pour le substrat Ang I par rapport à la big-ET-1. Par ailleurs, la diminution de la réponse biologique suivant l'injection de la big-ET-1 exogène chez la souris mMCP-4 KO n'a pas été observée avec l'Ang I exogène (Semaan *et al.*, 2015). Dans nos travaux, l'induction de la dégranulation mastocytaire n'a pas engendré de variation significative dans les réponses pressives suivant l'injection l'Ang I entre la souris de type sauvage et mMCP-4 KO, ceci étant une évidence supplémentaire que la chymase ne contribue pas à la voie métabolique de la production d'Ang II *in vivo* (Semaan *et al.*, 2015).

En effet, plusieurs études suggèrent que la mMCP-4 ne produirait pas l'Ang II physiologiquement au niveau vasculaire. Borland et ses collaborateurs ont montré que la chymase est présente dans l'adventice (couche externe du vaisseau), colocalisée avec les populations de mastocytes, alors que l'ECA est principalement localisée dans l'endothélium vasculaire. L'ECA étant lié à la membrane des cellules endothéliales avec son site catalytique exposé à la surface extracellulaire, cette équipe de recherche suggère que l'Ang I en circulation serait plus accessible à l'ECA qu'à la chymase (Borland *et al.*, 1998). De plus, en circulation, la chymase est rapidement inhibée de manière irréversible par des protéines plasmatiques (Walter *et al.*, 1996), ce qui contribue à limiter sa fonction biologique dans la production d'Ang II vasculaire. La chymase tissulaire, donc active, est susceptible d'avoir une plus grande importance dans les effets fonctionnels de l'Ang II sur les cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux sanguins (Borland *et al.*, 1998).

Une implication de la chymase aurait pu être mise en évidence avec l'utilisation d'un inhibiteur des ECE, tel que le CGS 35066 (Houde *et al.*, 2013). Cependant, ces analyses n'auraient pas reflété une contribution physiologique de la chymase dans la génération d'Ang II. Notre étude propose donc qu'il est peu probable que l'état de dégranulation mastocytaire puisse moduler la production mMCP-4-spécifique d'Ang II chez la souris. Cet état de fait n'a pas été documenté à ce jour dans la littérature.

4.2 Stabilisation mastocytaire

Le cromolyn est un agent stabilisateur des mastocytes et inhibe donc la dégranulation de ce type cellulaire. De nombreux groupes ont employé cet agent dans le but de comprendre

et d'étudier le rôle biologique des mastocytes chez la souris *in vivo* (Kusner *et al.*, 1973; Thomson et Evans, 1973; Pearce *et al.*, 1982; Kobayashi *et al.*, 1993).

L'inhibition de la dégranulation mastocytaire par le cromolyn a été confirmée par l'augmentation significative de l'activité mMCP-4 dans mastocytes péritonéaux. Toutefois, le cromolyn n'a pas eu d'impact significatif sur la stabilisation des mastocytes résidents des tissus pulmonaires. Malgré que les mastocytes pulmonaires soient majoritairement des mastocytes des tissus muqueux, il y a tout de même une population de mastocytes des tissus conjonctifs contenant de la chymase, tel que démontré dans la section précédente (Welle, 1997). Nos résultats suggèrent donc que ceux-ci pourraient potentiellement participer à la production d'ET-1 (1-31) lors de nos essais *in vivo*.

Nous avons démontré que le cromolyn supprimait la conversion de la big-ET-1 exogène en ET-1 (1-31) chez les mastocytes *in vitro*. Ces résultats suggèrent que la stabilisation des mastocytes inhibe la sécrétion de mMCP-4 dans le milieu extracellulaire, limitant significativement les propriétés hydrolytiques de celle-ci sur son substrat *in vitro*. La stabilisation des mastocytes péritonéaux a également atténué la réponse biologique de la big-ET-1 chez la souris *in vivo*. Cette modulation de la réponse hémodynamique à la big-ET-1 suggère que le cromolyn limiterait la génération d'ET-1 via l'inhibition de la voie métabolique chymase/NEP. De plus, l'administration d'ET-1 (1-31) et d'ET-1 ont produit la même réponse vasopressive chez les souris WT et mMCP-4 KO, avant et après induction de la stabilisation mastocytaire, ce qui renforce l'hypothèse d'une atteinte de la voie de métabolisme de la big-ET-1 en amont de l'ET-1 (1-31).

Nous avons précédemment rapporté une réduction de 40% de la réponse vasopressive de la big-ET-1 chez un modèle de souris réprimée pour la mMCP-4 (Houde *et al.*, 2013). Par ailleurs, dans la présente étude, nous observons une réduction de la réponse vasopressive de la big-ET-1 chez un modèle de stabilisation des mastocytes. Ces deux dernières observations suggèrent une contribution dynamique de la dégranulation mastocytaire dans le métabolisme mMCP-4-spécifique de la big-ET-1 en conditions physiologiques chez la souris, c'est-à-dire, sans modulation de l'exocytose.

Des évidences expérimentales ont démontré que l'ET-1 circulante pouvait induire la dégranulation des mastocytes péritonéaux chez la souris via la stimulation du récepteur ET_A exprimé à la surface cellulaire (Yamamura *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 2004). Ce mécanisme

permettrait de maintenir un niveau constant d'ET-1 via la voie alternative chymase-dépendante. Toutefois, Maurer *et al.* (2004), ont suggéré que cette dégranulation des mastocytes induite par l'ET-1 pourrait réduire les concentrations du peptide endogène par le biais d'un mécanisme autorégulateur. En effet, l'activation des mastocytes permettrait la libération de carboxypeptidase A pouvant dégrader l'ET-1 en fragment inactif, dans le but de limiter la toxicité du peptide vasopresseur (Schneider *et al.*, 2007).

Eszlári *et al.* (2008) supportent également cette association entre l'activation des mastocytes et l'ET-1. Ils rapportent que le maintien de l'équilibre de la pression artérielle est en partie contrôlé par les baroréflexes artériels agissant sur les cellules endothéliales, ce qui stimule la relâche du NO, et l'augmentation de l'expression de l'ARN messager de la prépro-ET-1 (Kuchan et Frangos, 1993; Fisslthaler *et al.*, 2000). Ce mécanisme permettrait une balance entre les niveaux d'ET-1 et de NO, favorisant un équilibre des paramètres hémodynamiques. Dans leur modèle d'étude, la perturbation de cet équilibre par l'induction d'une force de cisaillement provoque l'activation des mastocytes. Ceci contribue à maintenir un taux plasmatique d'ET-1 favorable par la relâche de protéases pouvant générer le peptide vaosactif. Dans leurs travaux, ils ont également démontré que le cromolyn inhibait l'effet inotrope causé la force de cisaillement, en corrélation avec des taux significativement plus faibles d'ET-1 plasmatiques (Eszlári *et al.*, 2008).

Ce dernier résultat pourrait suggérer que, dans notre modèle *in vivo*, le cromolyn réprime la production d'ET-1 en limitant la sécrétion de chymase. La présence limitée de l'enzyme réduirait la production d'ET-1 (1-31) à partir de son précurseur, et aurait pour effet d'atténuer la réponse biologique de la big-ET-1 exogène.

L'effet de la stabilisation des mastocytes sur la réponse pressive à l'Ang I dans un modèle *in vivo* n'a pas été rapporté à ce jour dans la littérature. Dans nos travaux, les réponses hémodynamiques suivant l'injection d'Ang I, avant et après l'administration par voie intrapéritonéale de cromolyn, n'ont pas été influencées chez les deux types de souris (WT et mMCP-4 KO), ajoutant une évidence supplémentaire que l'état de dégranulation mastocytaire n'influence pas le métabolisme de l'Ang I chez la souris *in vivo* tel que précédemment rapporté (Semaan *et al.*, 2015).

5 LIMITES ET APPROCHES ALTERNATIVES

Un élément manquant à prendre en considération dans notre recherche est l'étude de l'influence de l'exocytose mastocytaire sur les taux de conversion plasmatique de la big-ET-1 en ET-1 (1-31) et en ET-1, pouvant fournir une corrélation entre l'état de stabilité et la modulation de la réponse hémodynamique de la big-ET-1. En effet, nous avons tenté l'analyse par une approche par spectrométrie de masse (LC-MS/MS), précédée d'une extraction en phase solide (SPE), afin de purifier les peptides de l'échantillon complexe et d'éliminer les nombreuses protéines plasmatiques pouvant créer de l'interférence. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de doser les produits de métabolisme de la big-ET-1 exogène en raison de très faible conversion, n'atteignant pas la limite de la détection et de la sensibilité de cette méthode. Tel que décrit dans les travaux de Houde *et al.* (2013), une approche de purification par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) précédée d'un dosage selon une méthode immuno-enzymatique serait une méthode alternative favorable pour quantifier les niveaux plasmatiques des peptides biologiques (ET-1 (1-31) et ET-1) suivant l'injection de big-ET-1 exogène.

Nous avons par ailleurs utilisé un analogue ECA-résistant, le [Pro¹¹, D-Ala¹²] Ang I, connu pour être un indicateur de l'activité chymase, afin de mesurer une contribution de la mMCP-4 dans la génération d'Ang II. Par ailleurs, cet analogue a provoqué une augmentation de la PAM équivalente chez les souris WT et mMCP-4 KO, montrant la possibilité d'une voie alternative potentiellement impliquée dans le clivage de l'Ang I. Bien que plusieurs enzymes telles que la trypsine, la chymotrypsine, la tonine, la cathepsine G et la kallikréine puissent produire de l'Ang II à partir de l'Ang I *in vitro*, leurs rôles physiologiques *in vivo* n'ont pas été clarifiés (Urata *et al.*, 1996). De plus, dans nos travaux, nous avons utilisé une dose de l'analogue 200 fois supérieure à celle d'Ang I afin obtenir une réponse pressive similaire à celle utilisée du précurseur de l'Ang II. Il a été également suggéré qu'une forte concentration d'Ang I peut directement activer les récepteurs AT₁R de l'Ang II (Svane *et al.*, 1995), ce qui expliquerait la réponse pressive induite par l'analogue ECA-résistant chez la souris mMCP-4 KO. Également, la concentration très élevée de l'analogue peut possiblement faire intervenir d'autres voies de synthèse de l'Ang II. La prolongation de la réponse pressive obtenue dans les souris WT, illustrée par l'ASC, est

par contre attribuable à la mMCP-4. Il serait intéressant d'étudier la cinétique en présence de TY-51469, ou de chymostatin, un inhibiteur des chymotrypsines. Dans les travaux de Bordland *et al.* (1998), l'équipe de recherche n'a pas été en mesure d'observer, *in vitro*, une inhibition des effets contractiles à l'Ang I d'une part en présence d'un inhibiteur des ECA (captopril et énalapril), et d'autre part en présence d'inhibiteur de la chymase. En revanche, l'association des deux inhibiteurs a provoqué une inhibition des propriétés vasopressives de l'Ang I, sans toutefois la supprimer. La réponse biologique à l'Ang I a été réduite de 70 à 80%, suggérant l'existence d'autres voies de formation de l'Ang II indépendante de l'ECA et de la chymase, mais sensible à l'aprotinine et à la chymostatine, des inhibiteurs non-spécifiques des sérines protéases (Borland *et al.*, 1998). Ainsi, il n'est pas optimal d'utiliser cet analogue dans l'étude de la réponse pressive mMCP-4-dépendante à l'Ang I.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les travaux effectués dans cette étude démontrent que l'état de stabilité mastocytaire influence de manière significative la réponse hémodynamique mMCP-4-spécifique de la big-ET-1 chez la souris. De plus, les mastocytes semblent contribuer dynamiquement à la génération d'ET-1 en conditions physiologiques par la voie alternative chymase/NEP.

Bien que des études pharmacocinétiques antérieures ait démontré que la mMCP-4 convertie l'Ang I en Ang II *in vitro*, sa contribution dans un modèle *in vivo* n'est pas significative.

En conclusion, notre étude confirme que l'état de stabilité des mastocytes influence significativement les propriétés pharmacologiques de la mMCP-4 dans le métabolisme de la big-ET-1 *in vitro* et *in vivo*.

PERSPECTIVES

Suite à cette étude, il serait intéressant de valider, au niveau physiologique, si l'activation des mastocytes module la génération d'ET-1 endogène chez la souris.

Des études ont rapporté une augmentation significative des taux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 dans certaines pathologies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, l'athérosclérose et l'hypertension pulmonaire (Suzaki *et al.*, 2003; D'Orléans-Juste *et al.*, 2008; Kosanovic *et al.*, 2014). De plus, des niveaux augmentés d'ET-1 (1-31) plasmatiques et cardiaques sont rapportés chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde (Oka *et al.*, 2014). Il serait ainsi intéressant de corrélérer cette augmentation des taux d'ET-1 (1-31) et d'ET-1 à une sécrétion plus importante de chymase dans des conditions pathologiques impliquant une activation plus importante des mastocytes.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- ABRAHAM, S.N., ET ST. JOHN, A.L. (2010) Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 10(6): 440–52.
- AHMAD, S., ET FERRARIO, C.M. (2018) Chymase inhibitors for the treatment of cardiac diseases: a patent review (2010-2018). *Expert Opin Ther Pat* 28(11): 755–64.
- AKAHOSHI, F., ASHIMORI, A., SAKASHITA, H., YOSHIMURA, T., IMADA, T., NAKAJIMA, M., MITSUTOMI, N., KUWAHARA, S., OHTSUKA, T., FUKAYA, C., MIYAZAKI, M., ET NAKAMURA, N. (2001) Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Pharmacokinetic Profiles of Nonpeptidic α -Keto Heterocycles as Novel Inhibitors of Human Chymase. *J Med Chem* 44(8): 1286–96.
- AKASHI, K., TRAVER, D., MIYAMOTO, T., ET WEISSMAN, I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404(6774): 193–7.
- ALDENBORG, F., ET ENERBÄCK, L. (1985) Thymus Dependence of Connective Tissue Mast Cells: A Quantitative Cytofluorometric Study of the Growth of Peritoneal Mast Cells in Normal and Athymic Rats. *Int Arch Allergy Immunol* 78(3): 277–82.
- AMIN, K. (2012) The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* 106(1): 9–14.
- ARIDOR, M., ET SAGI-EISENBERG, R. (1990) Neomycin is a potent secretagogue of mast cells that directly activates a GTP-binding protein involved in exocytosis. *J Cell Biol* 111(6 Pt 2): 2885–91.
- ARINOBU, Y., IWASAKI, H., GURISH, M.F., MIZUNO, S., SHIGEMATSU, H., OZAWA, H., TENEN, D.G., AUSTEN, K.F., ET AKASHI, K. (2005) Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50): 18105–18110.
- ASSEM, E.S., ET MONGAR, J.L. (1970) Inhibition of allergic reactions in man and other species by cromoglycate. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 38(1): 68–77.
- ATIAKSHIN, D., BUCHWALOW, I., ET TIEMANN, M. (2019) Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. *Histochem Cell Biol* 152(4): 253–69.
- AZOUZ, N.P., HAMMEL, I., ET SAGI-EISENBERG, R. (2014) Characterization of mast cell secretory granules and their cell biology. *DNA Cell Biol* 33(10): 647–51.
- AZUMA, H., BANNO, K., ET YOSHIMURA, T. (1976) Pharmacological properties of N-(3',4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5'), a new anti-atopic agent. *Br J Pharmacol* 58(4): 483–8.
- BACANI, C., ET FRISHMAN, W.H. (2006) Chymase: A New Pharmacologic Target in Cardiovascular Disease. *Cardiol Rev* 14(4): 187–93.

- BALCELLS, E., MENG, Q.C., JOHNSON, W.H., OPARIL, S., ET DELL'ITALIA, L.J. (1997) Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273(4): H1769–74.
- BANOVAC, K., BANOVAC, F., YANG, J., ET KOREN, E. (1993) Interaction of osteoblasts with extracellular matrix: effect of mast cell chymase. *Proc Soc Exp Biol Med* 203(2): 221–35.
- BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT (2017) Substituted uracils as chymase inhibitors.
- BACON, C.R. ET DAVENPORT, A.P. (1996) Endothelin receptors in human coronary artery and aorta. *Br J Pharmacol* 117(5): 986–92.
- BENDITT, E.P. (1959) An enzyme in mast cells with properties like chymotrypsin. *J Exp Med* 110: 451–60.
- BLANK, U. (2011) The mechanisms of exocytosis in mast cells. *Adv Exp Med Biol* 716: 107–22.
- BLANK, U., ET VITTE, J. (2015) Les médiateurs du mastocyte. *Revue Française d'Allergologie* 55(1): 31–8.
- BLANK, U., MADERA-SALCEDO, I.K., DANELLI, L., CLAVER, J., TIWARI, N., SÁNCHEZ-MIRANDA, E., VÁZQUEZ-VICTORIO, G., RAMÍREZ-VALADEZ, K.A., MACIAS-SILVA, M., ET GONZÁLEZ-ESPINOSA, C. (2014) Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front Immunol* 5: 453.
- BÖHM, F., ET PERNOW, J. (2007) The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 76(1): 8–18.
- BORLAND, J.A., CHESTER, A.H., MORRISON, K.A., ET YACOUN, M.H. (1998) Alternative pathways of angiotensin II production in the human saphenous vein. *Br J Pharmacol* 125(3): 423–8.
- BOT, I., DE JAGER, S.C.A., ZERNECKE, A., LINDSTEDT, K.A., VAN BERKEL, T.J.C., WEBER, C., ET BIESSEN, E.A.L. (2007) Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 115(19): 2516–25.
- BOT, I., VAN BERKEL, T.J.C., ET BIESSEN, E.A.L. (2008) Mast cells: pivotal players in cardiovascular diseases. *Curr Cardiol Rev* 4(3): 170–8.
- BOT, I., DE JAGER, S.C.A., BOT, M., VAN HEININGEN, S.H., DE GROOT, P., VELDHUIZEN, R.W., VAN BERKEL, T.J.C., VON DER THÜSEN, J.H., ET BIESSEN, E.A.L. (2010) The neuropeptide substance P mediates adventitial mast cell activation and induces intraplaque hemorrhage in advanced atherosclerosis. *Circ Res* 106(1): 89–92.

- BOT, I., BOT, M., VAN HEININGEN, S.H., VAN SANTBRINK, P.J., LANKHUIZEN, I.M., HARTMAN, P., GRUENER, S., HILPERT, H., VAN BERKEL, T.J.C., FINGERLE, J., ET BIESSEN, E.A.L. (2011) Mast cell chymase inhibition reduces atherosclerotic plaque progression and improves plaque stability in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovasc Res* 89(1): 244–52.
- BRADDING, P., ET ARTHUR, G. (2016) Mast cells in asthma - state of the art. *Clin Exp Allergy* 46(2): 194–263.
- BREMNES, T., PAASCHE, J.D., MEHLUM, A., SANDBERG, C., BREMNES, B., ET ATTRAMADAL, H. (2000) Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 275(23): 17596–604.
- BUMPUS, F.M., SCHWARZ, H., ET PAGE, I.H. (1957). Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin. *Science* 125(3253): 886–7.
- CAMPBELL, D.J., ALEXIOU, T., XIAO, H.D., FUCKS, S., MCKINLEY, M.J., CORVOL, P., ET BERNSTEIN, K.E. (2004) Effect of Reduced Angiotensin-Converting Enzyme Gene Expression and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on Angiotensin and Bradykinin Peptide Levels in Mice. *Hypertension* 43(4), 854–9.
- CARTER, P., ET WELLS, J.A. (1988) Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 332(6164): 564–8.
- CASALE, T.B., BOWMAN, S., ET KALINER, M. (1984) Induction of human cutaneous mast cell degranulation by opiates and endogenous opioid peptides: evidence for opiate and nonopiate receptor participation. *J Allergy Clin Immunol* 73(3): 775–81.
- CASE, R.L. (1982) The Protective Effect of Lodoxamide on Antigen-Induced Bronchospasm: An Orally Active Antiallergic Drug. *JAMA* 247(5): 661.
- CASTILLO, J.G., OEHLING, A., ET GAMBOA, P.M. (1991) Mechanism of ketotifen action in hypersensitivity reactions. Its effect on cellular enzymatic activities. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1(5): 315–23.
- CAUGHEY, G.H., LEIDIG, F., VIRO, N.F., ET NADEL, J.A. (1988) Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 133–7.
- CAUGHEY, G.H., RAYMOND, W.W., ET WOLTERS, P.J. (2000) Angiotensin II generation by mast cell α - and β -chymases. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* 1480(1-2): 245–57.
- CECCARELLI, B., HURLBUT, W.P., ET MAURO, A. (1972) Depletion of vesicles from frog neuromuscular junctions by prolonged tetanic stimulation. *J Cell Biol* 54(1): 30–8.
- CHATTERJEE, A., GHOSH, J., ET KAPUR, R. (2015) Mastocytosis: a mutated KIT receptor induced myeloproliferative disorder. *Oncotarget* 6(21): 18250–64.

- CORVOL, P., WILLIAMS, T.A., ET SOUBRIER, F. (1995) Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Meth Enzymol* 248: 283–305.
- COX, J.S.G. (1971) Disodium cromoglycate—Mode of action and its possible relevance to the clinical use of the drug. *Br J Dis Chest* 65: 189–204.
- DAKHEL, S., PADILLA, L., ADAN, J., MASA, M., MARTINEZ, J.M., ROQUE, L., COLL, T., HERVAS, R., CALVIS, C., MESSEGUER, R., MITJANS, F., ET HERNANDEZ, J.L. (2014) S100P antibody-mediated therapy as a new promising strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Oncogenesis* 3(3): e92.
- DAVENPORT, A.P., HYNDMAN, K.A., DHAUN, N., SOUTHAN, C., KOHAN, D.E., POLLOCK, J.S., POLLOCK, D.M., WEBB, D.J., ET MAGUIRE, J.J. (2016) Endothelin. *Pharmacol Rev* 68(2): 357–418.
- DAVENPORT, A.P., O'REILLY, G., ET KUC, R.E. (1995) Endothelin ETA and ETB mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ETA sub-type. *Br J Pharmacol* 114(6): 1110–6.
- DESMARETS, J., GRESSER, O., GUEDIN, D., ET FRELIN, C. (1996) Interaction of Endothelin-1 with Cloned Bovine ETA Receptors: Biochemical Parameters and Functional Consequences. *Biochemistry* 35(47): 14868–75.
- DELL'ITALIA, L.J., COLLAWN, J.F., ET FERRARIO, C.M. (2018) Multifunctional Role of Chymase in Acute and Chronic Tissue Injury and Remodeling. *Circ Res* 122(2): 319–36.
- DENAULT, J.B., CLAING, A., D'ORLÉANS-JUSTE, P., SAWAMURA, T., KIDO, T., MASAKI, T., ET LEDUC, R. (1995) Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett* 362(3): 276–80.
- DOGGRELL, S.A. (2008) Therapeutic potential of non-peptide chymase inhibitors. *Expert Opin Ther Pat* 18(5): 485–99.
- DOGGRELL, S.A., ET WANSTALL, J.C. (2004) Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. *Cardiovasc Res* 61(4): 653–62.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P., PLANTE, M., HONORÉ, J.C., CARRIER, E., ET LABONTÉ, J. (2003). Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 81(6): 503–10.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P., HOUDE, M., RAE, G.A., BKAILY, G., CARRIER, E., ET SIMARD, E. (2008) Endothelin-1 (1-31): from chymase-dependent synthesis to cardiovascular pathologies. *Vascul Pharmacol* 49(2-3): 51–62.
- DOUGLAS, S.A., BECK, G.R., ELLIOTT, J.D., ET OHLSTEIN, E.H. (1995) Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br J Pharmacol* 114(8): 1529–40.

- DUDECK, A., DUDECK, J., SCHOLTEN, J., PETZOLD, A., SURIANARAYANAN, S., KÖHLER, A., PESCHKE, K., VÖHRINGER, D., WASKOW, C., KRIEG, T., ET AL. (2011) Mast Cells Are Key Promoters of Contact Allergy that Mediate the Adjuvant Effects of Haptens. *Immunity* 34(6): 973–84.
- DVORAK, A.M. (2005) Degranulation and recovery from degranulation of basophils and mast cells. *Chem Immunol Allergy* 85: 205–51.
- DWYER, D.F., BARRETT, N.A., AUSTEN, K.F., ET IMMUNOLOGICAL GENOME PROJECT CONSORTIUM (2016) Expression profiling of constitutive mast cells reveals a unique identity within the immune system. *Nat Immunol* 17(7): 878–87.
- ENERBÄCK, L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 3. Reactivity towards compound 48/80. *Acta Pathol Microbiol Scand* 66(3): 313–22.
- ENGELS, W., REITERS, P.H., DAEMEN, M.J., SMITS, J.F., ET VAN DER VUSSE, G.J. (1995) Transmural changes in mast cell density in rat heart after infarct induction *in vivo*. *J Pathol* 177(4): 423–9.
- ESZLÁRI, E., CZÓBEL, M., MOLNÁR, G., BOGÁTS, G., KASZAKI, J., NAGY, S., ET BOROS, M. (2008) Modulation of cardiac contractility through endothelin-1 release and myocardial mast cell degranulation. *Acta Physiol Hung* 95(3): 267–85.
- PECTEAU, M.-H., HONORÉ, J.-C., PLANTE, M., LABONTÉ, J., RAE, G.A., ET D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2005) Endothelin-1 (1-31) is an intermediate in the production of endothelin-1 after big endothelin-1 administration *in vivo*. *Hypertension* 46(1): 87–92.
- FERRY, X., EICHWALD, V., DAEFFLER, L., ET LANDRY, Y. (2001) Activation of $\beta\gamma$ Subunits of G_{i2} and G_{i3} Proteins by Basic Secretagogues Induces Exocytosis Through Phospholipase $C\beta$ and Arachidonate Release Through Phospholipase $C\gamma$ in Mast Cells. *J Immunol* 167(9): 4805–13.
- FISSLTHALER, B., DIMMELER, S., HERMANN, C., BUSSE, R., ET FLEMING, I. (2000) Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 168(1): 81–8.
- FOREMAN, J.C., ET GARLAND, L.G. (1976) Cromoglycate and other antiallergic drugs: a possible mechanism of action. *Br Med J* 1(6013): 820–1.
- FORSBERG, E., PEJLER, G., RINGVALL, M., LUNDERIUS, C., TOMASINI-JOHANSSON, B., KUSCHE-GULLBERG, M., ERIKSSON, I., LEDIN, J., HELLMAN, L., ET KJELLÉN, L. (1999) Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* 400(6746): 773–6.
- FROOGH, G., PINTO, J.T., LE, Y., KANDHI, S., ALELIGNE, Y., HUANG, A., ET SUN, D. (2017) Chymase-dependent production of angiotensin II: an old enzyme in old hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 312(2): H223–31.

- FUKURODA, T., FUJIKAWA, T., OZAKI, S., ISHIKAWA, K., YANO, M., ET NISHIKIBE, M. (1994) Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 199(3): 1461–5.
- GALLI, S.J. (2000) Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 7(1): 32–9.
- GALLI, S.J., ET TSAI, M. (2010) Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 40(7): 1843–51.
- GALLWITZ, M., ET HELLMAN, L. (2006) Rapid lineage-specific diversification of the mast cell chymase locus during mammalian evolution. *Immunogenetics* 58(8): 641–54.
- DE GARAVILLA, L., GRECO, M.N., SUKUMAR, N., CHEN, Z.-W., PINEDA, A.O., MATHEWS, F.S., DI CERA, E., GIARDINO, E.C., WELLS, G.I., HAERTLEIN, B.J., ET AL. (2005) A Novel, Potent Dual Inhibitor of the Leukocyte Proteases Cathepsin G and Chymase: Molecular mechanisms and anti-inflammatory activity *in vivo*. *J Biol Chem* 280(18): 18001–7.
- DE GASPARO, M., CATT, K.J., INAGAMI, T., WRIGHT, J.W., ET UNGER, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52(3): 415–72.
- GAUDENZIO, N. (2018) FcεRI and MRGPRX2 régulent différemment la dynamique de dégranulation des mastocytes. *Revue Française d'Allergologie* 58(2): 101–5.
- GILFILLAN, A.M., ET TKACZYK, C. (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 6(3): 218–30.
- GOLDSTEIN, S.M., LEONG, J., ET BUNNETT, N.W. (1991) Human mast cell proteases hydrolyze neurotensin, kinetensin and Leu5-enkephalin. *Peptides* 12(5): 995–1000.
- GOOSE, J., ET BLAIR, A.M. (1969) Passive cutaneous anaphylaxis in the rat, induced with two homologous reagin-like antibodies and its specific inhibition with disodium cromoglycate. *Immunology* 16(6): 749–60.
- HEUSTON, S., ET HYLAND, N. (2012) Chymase inhibition as a pharmacological target: a role in inflammatory and functional gastrointestinal disorders? Chymase inhibition in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 167(4): 732–40.
- HICKEY, K.A., RUBANYI, G., PAUL, R.J., ET HIGHSMITH, R.F. (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 248(5 Pt 1): C550–6.
- Higashijima, T., Burnier, J., et Ross, E.M. (1990) Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. *J Biol Chem* 265(24): 14176–86.

- HOSHINO, F., URATA, H., INOUE, Y., SAITO, Y., YAHIRO, E., IDEISHI, M., ARAKAWA, K., ET SAKU, K. (2003) Chymase inhibitor improves survival in hamsters with myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 41(Suppl 1): S11-8.
- HOUDE, M., JAMAIN, M.-D., LABONTÉ, J., DESBIENS, L., PEJLER, G., GURISH, M., TAKAI, S., ET D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2013) Pivotal role of mouse mast cell protease 4 in the conversion and pressor properties of Big-endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 346(1): 31–7.
- HOUDE, M., SCHWERTANI, A., TOUIL, H., DESBIENS, L., SARRHINI, O., LECOMTE, R., LEPAGE, M., GAGNON, H., TAKAI, S., PEJLER, G., JACQUES, D., GOBEIL, F. JR., DAY, R., ET D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2018) Mouse Mast Cell Protease 4 Deletion Protects Heart Function and Survival After Permanent Myocardial Infarction. *Front Pharmacol* 9: 868.
- HUMPHRIES, D.E., WONG, G.W., FRIEND, D.S., GURISH, M.F., QIU, W.T., HUANG, C., SHARPE, A.H., ET STEVENS, R.L. (1999) Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 400(6746): 769–72.
- IMADA, T., KOMORITA, N., KOBAYASHI, F., NAITO, K., YOSHIKAWA, T., MIYAZAKI, M., NAKAMURA, N., ET KONDO, T. (2002) Therapeutic potential of a specific chymase inhibitor in atopic dermatitis. *Jpn J Pharmacol* 90(3): 214–7.
- IRMAN-FLORJANC, T., ET ERJAVEC, F. (1983) Compound 48/80 and substance P induced release of histamine and serotonin from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions* 13(2-3): 138–41.
- JACKSON, T.R., BLAIR, L.A., MARSHALL, J., GOEDERT, M., ET HANLEY, M.R. (1988) The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335(6189): 437–40.
- JENG, A.Y., MULDER, P., KWAN, A.-L., ET BATTISTINI, B. (2002) Nonpeptidic endothelin-converting enzyme inhibitors and their potential therapeutic applications. *Can J Physiol Pharmacol* 80(5): 440–9.
- JONES, S., ET HOWL, J. (2006) Biological applications of the receptor mimetic peptide mastoparan. *Curr Protein Pept Sci* 7(6): 501–8.
- KAKIMOTO, K., TAKAI, S., MURANO, M., ISHIDA, K., YODA, Y., INOUE, T., JIN, D., UMEGAKI, E., ET HIGUCHI, K. (2010) Significance of chymase-dependent matrix metalloproteinase-9 activation on indomethacin-induced small intestinal damages in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 332(2): 684–9.
- KAKOL PALM, D., ET HOLLÄNDER, P. (2007) A procedure for intravenous injection using external jugular vein in Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim* 41(3): 403–5.
- KAMOHARA, M., MATSUO, A., TAKASAKI, J., KOHDA, M., MATSUMOTO, M., MATSUMOTO, S., SOGA, T., HIYAMA, H., KOBORI, M., ET KATOU, M. (2005) Identification of MrgX2 as

- a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 330(4): 1146–52.
- KANEFENDT, F., THUB, U., BECKA, M., BOXNICK, S., BERSE, M., SCHULTZ, A., ET OTTO, C. (2019) Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of the Novel Chymase Inhibitor BAY 1142524 in Healthy Male Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev* 8(4): 467–79.
- KATO, M., NISHIDA, A., AGA, Y., KITA, J., KUDO, Y., NARITA, H., ET ENDO, T. (1997) Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of central effect of the novel antiallergic agent betotastine besilate. *Arzneimittelforschung* 47(10): 1116–24.
- KITAMURA, Y. (1989) Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 7: 59–76.
- KLEIN, O., ET SAGI-EISENBERG, R. (2019) Anaphylactic Degranulation of Mast Cells: Focus on Compound Exocytosis. *J Immunol Res* 2019: 9542656.
- KLINKER, J.F., ET SEIFERT, R. (1997) Morphine and muscle relaxants are receptor-independent G-protein activators and cromolyn is an inhibitor of stimulated G-protein activity. *Inflamm Res* 46(2): 46–50.
- KOBAYASHI, K., HIROI, J., KISHI, S., SAWASE, K., HIRAYAMA, Y., CHIHARA, S., IMAI, T., SHIGI, Y., SHIMOMURA, K., ET KOHSAKA, M. (1993) Effects of quinotolast, a new orally active antiallergic drug, on experimental allergic models. *Jpn J Pharmacol* 63(1): 73–81.
- KOFFORD, M.W., SCHWARTZ, L.B., SCHECHTER, N.M., YAGER, D.R., DIEGELMANN, R.F., ET GRAHAM, M.F. (1997) Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *J Biol Chem* 272(11): 7127–31.
- KOHARA, K., BRIDGET-BROSNIHAN, K., ET FERRARIO, C.M. (1993) Angiotensin(1–7) in the spontaneously hypertensive rat. *Peptides* 14(5): 883–91.
- KOKKONEN, J.O., ET KOVANEN, P.T. (1989) Proteolytic enzymes of mast cell granules degrade low density lipoproteins and promote their granule-mediated uptake by macrophages *in vitro*. *J Biol Chem* 264(18): 10749–55.
- KOMEDA, K., TAKAI, S., JIN, D., TASHIRO, K., HAYASHI, M., TANIGAWA, N., ET MIYAZAKI, M. (2010) Chymase inhibition attenuates tetrachloride-induced liver fibrosis in hamsters: Chymase inhibitor attenuates liver fibrosis. *Hepatol Res* 40(8): 832–40.
- KONDO, S., MORITA, T., ET TASHIMA, Y. (1994) Endothelin receptor density in human hypertrophic and non-hypertrophic prostate tissue. *Tohoku J Exp Med* 172(4): 381–4.
- KONDO, M., WEISSMAN, I.L., ET AKASHI, K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91(5): 661–72.

- KOSANOVIC, D., DAHAL, B.K., PETERS, D.M., SEIMETZ, M., WYGRECKA, M., HOFFMANN, K., ANTEL, J., REISS, I., GHOFRANI, H.A., WEISSMANN, N., ET AL. (2014) Histological Characterization of Mast Cell Chymase in Patients with Pulmonary Hypertension and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pulm Circ* 4(1): 128–36.
- KRAFT, S., ET KINET, J.-P. (2007) New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 7(5): 365–78.
- KRISHNASWAMY, G., KELLEY, J., JOHNSON, D., YOUNGBERG, G., STONE, W., HUANG, S.K., BIEBER, J., ET CHI, D.S. (2001) The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci* 6: D1109-27.
- KRUGER, N.J. (1994) The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 32: 9–15.
- KUCHAN, M.J., ET FRANGOS, J.A. (1993) Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 264(1 Pt 2): H150-6.
- KUNORI, Y., KOIZUMI, M., MASEGI, T., KASAI, H., KAWABATA, H., YAMAZAKI, Y., ET FUKAMIZU, A. (2002) Rodent alpha-chymases are elastase-like proteases. *Eur J Biochem* 269(23): 5921–30.
- KUNORI, Y., MUROGA, Y., IIDAKA, M., MITSUHASHI, H., KAMIMURA, T., ET FUKAMIZU, A. (2005) Species Differences in Angiotensin II Generation and Degradation by Mast Cell Chymases. *J Recept Sig Transd* 25(1): 35–44.
- KUSNER, E.J., DUBNICK, B., ET HERZIG, D.J. (1973) The inhibition by disodium cromoglycate *in vitro* of anaphylactically induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 184(1): 41–6.
- LACY, P., ET STOW, J.L. (2011) Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* 118(1): 9–18.
- LANTZ, C.S., BOESIGER, J., SONG, C.H., MACH, N., KOBAYASHI, T., MULLIGAN, R.C., NAWA, Y., DRANOFF, G., ET GALLI, S.J. (1998) Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392(6671): 90–3.
- LAZAAR, A.L., PLOTNICK, M.I., KUCICH, U., CRICHTON, I., LOTFI, S., DAS, S.K.P., KANE, S., ROSENBLUM, J., PANETTIERI, R.A., SCHECHTER, N.M., ET PURÉ, E. (2002) Mast cell chymase modifies cell-matrix interactions and inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Immunol* 169(2): 1014–20.
- LEE, M., CALABRESI, L., CHIESA, G., FRANCESCHINI, G., ET KOVANEN, P.T. (2002) Mast cell chymase degrades apoE and apoA-II in apoA-I-knockout mouse plasma and reduces its ability to promote cellular cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 22(9): 1475–81.

- LEMARIÉ, C.A., ET SCHIFFRIN, E.L. (2010) The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11(1): 19–31.
- LENNARTSSON, J., ET RÖNNSTRAND, L. (2012) Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* 92(4): 1619–49.
- LESKINEN, M.J., LINDSTEDT, K.A., WANG, Y., ET KOVANEN, P.T. (2003) Mast Cell Chymase Induces Smooth Muscle Cell Apoptosis by a Mechanism Involving Fibronectin Degradation and Disruption of Focal Adhesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(2): 238–43.
- LEVICK, S.P., MELENDEZ, G.C., PLANTE, E., McLARTY, J.L., BROWER, G.L., ET JANICKI, J.S. (2011) Cardiac mast cells: the centrepiece in adverse myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 89(1): 12–9.
- LI, M., LIU, K., MICHALICEK, J., ANGUS, J.A., HUNT, J.E., DELL'ITALIA, L.J., FENELEY, M.P., GRAHAM, R.M., ET HUSAIN, A. (2004) Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *J Clin Invest* 114(1): 112–20.
- LIAO, C., AKAZAWA, H., TAMAGAWA, M., ITO, K., YASUDA, N., KUDO, Y., YAMAMOTO, R., OZASA, Y., FUJIMOTO, M., WANG, P., NAKAUCHI, H., NAKAYA, H., ET KOMURO, I. (2010) Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest* 120(1): 242–53.
- LINDSTEDT, L., LEE, M., ET KOVANEN, P.T. (2001) Chymase bound to heparin is resistant to its natural inhibitors and capable of proteolyzing high density lipoproteins in aortic intimal fluid. *Atherosclerosis* 155(1): 87–97.
- LIU, J., DIVOUX, A., SUN, J., ZHANG, J., CLÉMENT, K., GLICKMAN, J.N., SUKHOVA, G.K., WOLTERS, P.J., DU, J., GORGUN, C.Z., ET AL. (2009) Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 15(8): 940–5.
- LONGLEY, B.J., TYRRELL, L., MA, Y., WILLIAMS, D.A., HALABAN, R., LANGLEY, K., LU, H.S., ET SCHECHTER, N.M. (1997) Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proc. Natl Acad Sci U S A* 94(17): 9017–21.
- LORENTZ, A., BAUMANN, A., VITTE, J., ET BLANK, U. (2012) The SNARE Machinery in Mast Cell Secretion. *Front Immun* 3(5): 143.
- MALBEC, O., ROGET, K., SCHIFFER, C., IANNASCOLI, B., DUMAS, A.R., AROCK, M., ET DAËRON, M. (2007) Peritoneal cell-derived mast cells: an *in vitro* model of mature serosal-type mouse mast cells. *J Immunol* 178(10): 6465–75.
- MARYANOFF, B.E., DE GARAVILLA, L., GRECO, M.N., HAERTLEIN, B.J., WELLS, G.I., ANDRADE-GORDON, P., ET ABRAHAM, W.M. (2010) Dual inhibition of cathepsin G and chymase is effective in animal models of pulmonary inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 181(3): 247–53.

- MASAKI, T., ET YANAGISAWA, M. (1992) Endothelins. *Essays Biochem* 27: 79–89.
- MATSUMOTO, T., WADA, A., TSUTAMOTO, T., OHNISHI, M., ISONO, T., ET KINOSHITA, M. (2003) Chymase Inhibition Prevents Cardiac Fibrosis and Improves Diastolic Dysfunction in the Progression of Heart Failure. *Circulation* 107(20): 2555–8.
- MAZZUCA, M.Q., ET KHALIL, R.A. (2012) Vascular endothelin receptor type B: Structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochem Pharmacol* 84(2): 147–62.
- MCNEIL, B.D., PUNDIR, P., MEEKER, S., HAN, L., UNDEM, B.J., KULKA, M., ET DONG, X. (2015) Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature* 519(7542): 237–41.
- METCALFE, D.D., MEKORI, J.A., ET ROTTEM, M. (1995) Mast cell ontogeny and apoptosis. *Exp. Dermatol* 4(4): 227–30.
- METCALFE, D.D., BARAM, D., ET MEKORI, Y.A. (1997) Mast cells. *Physiol Rev* 77(4): 1033–79.
- METZLER, B., ET XU, Q. (1997) The Role of Mast Cells in Atherosclerosis. *Int Arch Allergy Immunol* 114(1): 10–4.
- MIYAZAKI, M., TAKAI, S., JIN, D., ET MURAMATSU, M. (2006) Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Therapeut* 112(3): 668–76.
- MIZUTANI, H., SCHECHTER, N., LAZARUS, G., BLACK, R.A., ET KUPPER, T.S. (1991) Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med* 174(4): 821–5.
- MOLENAAR, P., KUC, R.E. ET DAVENPORT, A.P. (1992) Characterization of two new ETB selective radioligands, [125I]-BQ3020 and [125I]-[Ala1,3,11,15]ET-1 in human heart. *Br J Pharmacol* 107(3): 637–9.
- MOORE, J.E., ET JAMES, G.W. (1953) A simple direct method for absolute basophil leucocyte count. *Proc Soc Exp Biol Med* 82(4): 601–3.
- MORGAN, L., BROUGHTON PIPKIN, F., ET KALSHEKER, N. (1996) Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol* 28(11): 1211–22.
- MOTA, I. (1963) Biological characterization of “mast cell sensitizing” antibodies. *Life Sci* 2(7): 465–74.
- MOTA, I. (1994) The discovery of the relationship between mast cells, histamine and IgE. *Immunol Today* 15(5): 242–5.

- MOUSLI, M., BUEB, J.L., BRONNER, C., ROUOT, B., ET LANDRY, Y. (1990) G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol Sci* 11(9): 358–62.
- MOUSLI, M., HUGLI, T.E., LANDRY, Y., ET BRONNER, C. (1994) Peptidergic pathway in human skin and rat peritoneal mast cell activation. *Immunopharmacology* 27(1): 1–11.
- MULLOY, B., LEVER, R., ET PAGE, C.P. (2017) Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconj J* 34(3): 351–61.
- MURAKAMI, M., KARNIK, S.S., ET HUSAIN, A. (1995) Human Prochymase Activation: A novel role for heparin in zymogen processing. *J Biol Chem* 270(5): 2218–23.
- MURRAY, D.B., GARDNER, J.D., BROWER, G.L., ET JANICKI, J.S. (2004) Endothelin-1 mediates cardiac mast cell degranulation, matrix metalloproteinase activation, and myocardial remodeling in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(5): H2295–9.
- NAKANO, A., KISHI, F., MINAMI, K., WAKABAYASHI, H., NAKAYA, Y., ET KIDO, H. (1997) Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol* 159(4): 1987–92.
- NAKANO, T., SONODA, T., HAYASHI, C., YAMATODANI, A., KANAYAMA, Y., YAMAMURA, T., ASAI, H., YONEZAWA, T., KITAMURA, Y., ET GALLI, S.J. (1985) Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* 162(3): 1025–43.
- NISHIMURA, H., BUIKEMA, H., BALTATU, O., GANTEN, D., ET URATA, H. (1998) Functional evidence for alternative ANG II-forming pathways in hamster cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275(4): H1307–12.
- OGATA, A., FUJIEDA, Y., TERAOKA, M., MUTO, T., TANAKA, T., MARUOKA, H., NAGAHIRA, K., FUKUDA, Y., TOMIMORI, Y., ET WATANABE, N. (2011) Pharmacokinetic/pharmacodynamic analyses of chymase inhibitor SUN13834 in NC/Nga mice and prediction of effective dosage for atopic dermatitis patients. *Int Immunopharmacol* 11(10): 1628–32.
- OKA, M., NIWA, Y., MAWATARI, K., HIASA, Y., ET NAKAYA, Y. (2014) A novel peptide of endothelin family, 31 amino-acid length endothelin in patients with acute myocardial infarction. *J Med Invest* 61(3-4): 298–305.
- OKA, T., KALESNIKOFF, J., STARKL, P., TSAI, M., ET GALLI, S.J. (2012) Evidence questioning cromolyn's effectiveness and selectivity as a "mast cell stabilizer" in mice. *Lab Invest* 92(10): 1472–82.

- ORR, T.S., HALL, D.E., Gwilliam, J.M., ET COX, O.S. (1971) The effect of disodium cromoglycate on the release of histamine and degranulation of rat mast cells induced by compound 48-80. *Life Sci* 10(14): 805–12.
- OYAMADA, S., BIANCHI, C., TAKAI, S., CHU, L.M., ET SELLKE, F.W. (2011). Chymase Inhibition Reduces Infarction and Matrix Metalloproteinase-9 Activation and Attenuates Inflammation and Fibrosis after Acute Myocardial Ischemia/Reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 339(1): 143–51.
- OZAKI, S., OHWAKI, K., IHARA, M., FUKURODA, T., ISHIKAWA, K., ET YANO, M. (1995) ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209(2): 483–9.
- PALOMÄKI, V.A.B., ET LAITINEN, J.T. (2006) The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT_{1A} receptors in rat brain sections. *Br J Pharmacol* 147(6): 596–606.
- PATON, W.D.M. (1951) Compound 48/80: a potent histamine liberator. *Br J Pharmacol Chemother* 6(3): 499–508.
- DE PAULIS, A., MINOPOLI, G., ARBUSTINI, E., DE CRESCENZO, G., DAL PIAZ, F., PUCCI, P., RUSSO, T., ET MARONE, G. (1999) Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells. *J Immunol* 163(5): 2799–808.
- PEARCE, F.L., BEFUS, A.D., GAULDIE, J., ET BIENENSTOCK, J. (1982) Mucosal mast cells. II. Effects of anti-allergic compounds on histamine secretion by isolated intestinal mast cells. *J Immunol* 128(6): 2481–6.
- PEJLER, G., ET KARLSTRÖM, A. (1993) Thrombin is inactivated by mast cell secretory granule chymase. *J Biol Chem* 268(16): 11817–22.
- PEJLER, G., SÖDERSTRÖM, K., ET KARLSTRÖM, A. (1994) Inactivation of thrombin by a complex between rat mast-cell protease 1 and heparin proteoglycan. *Biochem J* 299(Pt 2): 507–13.
- PEJLER, G., ÅBRINK, M., RINGVALL, M., ET WERNERSSON, S. (2007) Mast Cell Proteases. *Adv Immunol* 95: 167–255.
- PEJLER, G., RONNBERG, E., WAERN, I., ET WERNERSSON, S. (2010) Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 115(24): 4981–90.
- PILIPONSKY, A.M., CHEN, C.-C., RIOS, E.J., TREUTING, P.M., LAHIRI, A., ABRINK, M., PEJLER, G., TSAI, M., ET GALLI, S.J. (2012) The chymase mouse mast cell protease 4 degrades TNF, limits inflammation, and promotes survival in a model of sepsis. *Am J Pathol* 181(3): 875–86.

- POREBSKI, G., KWIECIEN, K., PAWICA, M., ET KWITNIEWSKI, M. (2018) Mas-Related G Protein-Coupled Receptor-X2 (MRGPRX2) in Drug Hypersensitivity Reactions. *Front Immunol* 9: 3027.
- QI, X., HONG, J., CHAVES, L., ZHUANG, Y., CHEN, Y., WANG, D., CHABON, J., GRAHAM, B., OHMORI, K., LI, Y., ET HUANG, H. (2013) Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBP α and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity* 39(1): 97–110.
- RAO, K.N., ET BROWN, M.A. (2008) Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1143: 83–104.
- RAPOSO, G., TENZA, D., MECHERI, S., PERONET, R., BONNEROT, C., ET DESAYMARD, C. (1997) Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 8(12): 2631–45.
- RAYMOND, W.W., RUGGLES, S.W., CRAIK, C.S., ET CAUGHEY, G.H. (2003) Albumin Is a Substrate of Human Chymase: Prediction by combinatorial peptide screening and development of a selective inhibitor based on the albumin cleavage site. *J Biol Chem* 278(36): 34517–24.
- RAYMOND, W.W., SU, S., MAKAROVA, A., WILSON, T.M., CARTER, M.C., METCALFE, D.D., ET CAUGHEY, G.H. (2009) 2-Macroglobulin Capture Allows Detection of Mast Cell Chymase in Serum and Creates a Reservoir of Angiotensin II-Generating Activity. *J Immunol* 182(9): 5770–7.
- REILING, K.K., KRUCINSKI, J., MIERCKE, L.J.W., RAYMOND, W.W., CAUGHEY, G.H., ET STROUD, R.M. (2003) Structure of Human Pro-Chymase: A Model for the Activating Transition of Granule-Associated Proteases. *Biochemistry* 42(9): 2616–24.
- REILLY, C.F., SCHECHTER, N.B., ET TRAVIS, J. (1985) Inactivation of bradykinin and kallidin by cathepsin G and mast cell chymase. *Biochem Biophys Res Commun* 127(2): 443–9.
- RILEY, J.F., ET WEST, G.B. (1953) The presence of histamine in tissue mast cells. *J Physiol* 120(4): 528–37.
- RILEY, J.F., ET WEST, G.B. (1955) Tissue mast cells. Studies with a histamine-liberator of low toxicity (compound 48/80). *J Pathol* 69(1): 269–82.
- RIVERA, J., FIERRO, N.A., OLIVERA, A., ET SUZUKI, R. (2008) New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Adv Immunol* 98: 85–120.
- ROBAS, N., MEAD, E., ET FIDOCK, M. (2003) MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem* 278(45): 44400–4.

- RÖHLICH, P., ANDERSON, P., ET UVNÄS, B. (1971) Electron microscope observations on compounds 48-80-induced degranulation in rat mast cells. Evidence for sequential exocytosis of storage granules. *J Cell Biol* 51(21): 465–83.
- ROSENGARD, B.R., MAHALIK, C., ET COCHRANE, D.E. (1986) Mast cell secretion: differences between immunologic and non-immunologic stimulation. *Agents Actions* 19(3-4): 133–40.
- ROTHSCHILD, A.M. (1970) Mechanisms of histamine release by compound 48-80. *Br J Pharmacol* 38(1): 253–62.
- RUSSELL, F.D., ET DAVENPORT A.P. (1996) Characterization of the binding of endothelin ETB selective ligands in human and rat heart. *Br J Pharmacol* 119(4): 631-6.
- SAARINEN, J., KALKKINEN, N., WELGUS, H.G., ET KOVANEN, P.T. (1994) Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *J Biol Chem* 269(27): 18134–40.
- SAITO, K., MUTO, T., TOMIMORI, Y., IMAJO, S., MARUOKA, H., TANAKA, T., YAMASHIRO, K., ET FUKUDA, Y. (2003) Mouse mast cell protease-1 cleaves angiotensin I to form angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 302(4): 773–7.
- SAMOSZUK, M., ET CORWIN, M.A. (2003) Mast cell inhibitor cromolyn increases blood clotting and hypoxia in murine breast cancer. *Int J Cancer* 107(1): 159–63.
- SANKER, S., CHANDRASEKHARAN, U.M., WILK, D., GLYNIAS, M.J., KARNIK, S.S., ET HUSAIN, A. (1997) Distinct multisite synergistic interactions determine substrate specificities of human chymase and rat chymase-1 for angiotensin II formation and degradation. *J Biol Chem* 272(5): 2963–8.
- SCHECHTER, N.M., SPROWS, J.L., SCHOENBERGER, O.L., LAZARUS, G.S., COOPERMAN, B.S., ET RUBIN, H. (1989) Reaction of human skin chymotrypsin-like proteinase chymase with plasma proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 264(35): 21308–15.
- SCHNEIDER, L.A., SCHLENNER, S.M., FEYERABEND, T.B., WUNDERLIN, M., ET RODEWALD, H.-R. (2007) Molecular mechanism of mast cell-mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. *J Exp Med* 204(11): 2629–39.
- SEMAAN, W., DESBIENS, L., HOUDE, M., LABONTÉ, J., GAGNON, H., YAMAMOTO, D., TAKAI, S., LAIDLAW, T., BKAILY, G., SCHWERTANI, A., PEJLER, G., LEVESQUE, C., DESJARDINS, R., DAY, R., ET D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2015) Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1-31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase. *Biochem Pharmacol* 94(2): 91–100.
- SHAPIRO, G.G., ET KÖNIG, P. (1985) Cromolyn sodium: a review. *Pharmacotherapy* 5(3): 156–70.

- SHARIF, N.A., XU, S.X., MILLER, S.T., GAMACHE, D.A., ET YANNI, J.M. (1996) Characterization of the ocular antiallergic and antihistaminic effects of olopatadine (AL-4943A), a novel drug for treating ocular allergic diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 278(3): 1252–61.
- SHAW, R.J., ET KAY, A.B. (1985) Nedocromil, a mucosal and connective tissue mast cell stabilizer, inhibits exercise-induced asthma. *Br J Dis Chest* 79(4): 385–9.
- SIMARD, E., JIN, D., TAKAI, S., MIYAZAKI, M., BROCHU, I., ET D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2009) Chymase-dependent conversion of Big endothelin-1 in the mouse *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 328(2): 540–8.
- SINNIAH, A., YAZID, S., ET FLOWER, R.J. (2017) The Anti-allergic Cromones: Past, Present, and Future. *Front Pharmacol* 8: 827.
- SKEDINGER, M.C., AUGUSTINE, N.H., MORRIS, E.Z., NIELSON, D.W., ZIMMERMAN, G.A., ET HILL, H.R. (1987) Effect of disodium cromoglycate on neutrophil movement and intracellular calcium mobilization. *J Allergy Clin Immunol* 80(4): 573–7.
- SKEGGS, L.T., KAHN, J.R., ET SHUMWAY, N.P. (1956) The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 103(3): 295–9.
- SOGA, Y., TAKAI, S., KOYAMA, T., OKAMOTO, Y., IKEDA, T., NISHIMURA, K., MIYAZAKI, M., ET KOMEDA, M. (2004) Attenuation of adhesion formation after cardiac surgery with a chymase inhibitor in a hamster model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127(1): 72–8.
- STONE, K.D., PRUSSIN, C., ET METCALFE, D.D. (2010) IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2): S73–80.
- STOW, J.L., CHING LOW, P., OFFENHÄUSER, C., ET SANGERMANI, D. (2009) Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. *Immunobiology* 214(7): 601–12.
- SUBRAMANIAN, H., GUPTA, K., GUO, Q., PRICE, R., ET ALI, H. (2011) Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *J Biol Chem* 286(52): 44739–49.
- SULCOVA, J., MEYER, M., GUIDUCCI, E., FEYERABEND, T.B., RODEWALD, H.-R., ET WERNER, S. (2015) Mast cells are dispensable in a genetic mouse model of chronic dermatitis. *Am J Pathol* 185(6): 1575–87.
- SUN, J., ZHANG, J., LINDHOLT, J.S., SUKHOVA, G.K., LIU, J., HE, A., ABRINK, M., PEJLER, G., STEVENS, R.L., THOMPSON, R.W., ENNIS, T.L., GURISH, M.F., LIBBY, P., ET SHI, G.P. (2009) Critical role of mast cell chymase in mouse abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 120(11): 973–82.

- SUZAKI, Y., YOSHIKUMI, M., YAMASHITA, Y., ABE, S., TSUCHIYA, K., SATOH, Y., KURODA, Y., HORIKE, K., KANO, M., FUKATA, Y., ET AL. (2003) Determination of plasma concentrations of endothelin-1(1-31) and endothelin-1 in healthy subjects and patients with atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 41(Suppl 1): S83-7.
- SVANE, D., KAHR, O., HANSEN, V.B., HOLM-NIELSEN, P., ET FORMAN, A. (1995) Angiotensin-converting enzyme activity and contractile effects of angiotensin I and II in human uteroplacental arteries. *Am J Obstet Gynecol* 172(3): 991-7.
- TAIPALE, J., LOHI, J., SAARINEN, J., KOVANEN, P.T., ET KESKI-OJA, J. (1995) Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem* 270(3): 4689-96.
- TAKAI, S., JIN, D., OHZU, M., TANAKA, K., ET MIYAZAKI, M. (2009) Chymase Inhibition Provides Pancreatic Islet Protection in Hamsters With Streptozotocin-Induced Diabetes. *J Pharmacol Sci* 110(4): 459-65.
- TARIQ, M., MOUTAERY, M.A., ELFAKI, I., ARSHADUDDIN, M., ET KHAN, H.A. (2006) Protective effects of nedocromil sodium and sodium cromoglycate on gastroduodenal ulcers: a comparative study in rats. *Inflammopharmacology* 14(3-4): 163-9.
- TATEMOTO, K., NOZAKI, Y., TSUDA, R., KONNO, S., TOMURA, K., FURUNO, M., OGASAWARA, H., EDAMURA, K., TAKAGI, H., IWAMURA, H., NOGUCHI, M., ET NAITO, T. (2006) Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 349(4): 1322-8.
- TCHOUGOUNOVA, E., ET PEJLER, G. (2001) Regulation of extravascular coagulation and fibrinolysis by heparin-dependent mast cell chymase. *FASEB J* 15(14): 2763-5.
- TCHOUGOUNOVA, E., PEJLER, G., ET ÅBRINK, M. (2003) The Chymase, Mouse Mast Cell Protease 4, Constitutes the Major Chymotrypsin-like Activity in Peritoneum and Ear Tissue. A Role for Mouse Mast Cell Protease 4 in Thrombin Regulation and Fibronectin Turnover. *J Exp Med* 198(3): 423-31.
- TCHOUGOUNOVA, E., LUNDEQUIST, A., FAJARDO, I., WINBERG, J.-O., ÅBRINK, M., ET PEJLER, G. (2005) A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem* 280(10): 9291-6.
- THEOHARIDES, T.C., KEMPURAJ, D., TAGEN, M., CONTI, P., ET KALOGEROMITROS, D. (2007) Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev* 217: 65-78.
- THOMSON, D.S., ET EVANS, D.P. (1973) Inhibition of immediate hypersensitivity reactions by disodium cromoglycate. *Clin Exp Immunol* 13(4): 537-44.
- TIGERSTEDT, R., ET BERGMAN, P.Q. (1898) Niere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie* 8(1): 223-71.

- TOUYZ, R.M. (2005) Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 90(4): 449–55.
- TOUYZ, R.M., ET SCHIFFRIN, E.L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52(4): 639–72.
- TSUKAHARA, Y., MATSUMURA, Y., KUNINOBU, K., KOJIMA, T., TAKAOKA, M., ET MORIMOTO, S. (1993) Phosphoramidon-sensitive endothelin converting enzyme in cultured vascular smooth muscle cells converts big endothelin-3 to endothelin-3. *Life Sci* 53(6): 465–71.
- TURNER, A.J., ET HOOPER, N.M. (2002) The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 23(4): 177–83.
- URATA, H., HEALY, B., STEWART, R.W., BUMPUS, F.M., ET HUSAIN, A. (1990a) Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* 66(4): 883–90.
- URATA, H., KINOSHITA, A., MISONO, K.S., BUMPUS, F.M., ET HUSAIN, A. (1990b) Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 265(36): 22348–57.
- URATA, H., NISHIMURA, H., ET GANTEN, D. (1996) Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens* 9(3): 277–84.
- VARTIO, T., SEPPÄ, H., ET VAHERI, A. (1981) Susceptibility of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteinases, mast cell chymase and cathepsin G. *J Biol Chem* 256(1): 471–7.
- VOEHRINGER, D. (2013) Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat. Rev Immunol* 13(5): 362–75.
- WALTER, M., PLOTNICK, M., ET SCHECHTER, N.M. (1996) Inhibition of human mast cell chymase by secretory leukocyte proteinase inhibitor: enhancement of the interaction by heparin. *Arch Biochem Biophys* 327(1): 81–8.
- WANG, H., WANG, H.S., ET LIU, Z.P. (2011) Agents that induce pseudo-allergic reaction. *Drug Discov Ther* 5(5): 211–9.
- WANG, Y., SHIOTA, N., LESKINEN, M.J., LINDSTEDT, K.A., ET KOVANEN, P.T. (2001) Mast cell chymase inhibits smooth muscle cell growth and collagen expression *in vitro*: transforming growth factor-beta1-dependent and -independent effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(12): 1928–33.
- WEI, C.-C., HASE, N., INOUE, Y., BRADLEY, E.W., YAHIRO, E., LI, M., NAQVI, N., POWELL, P.C., SHI, K., TAKAHASHI, Y., ET AL. (2010) Mast cell chymase limits the cardiac efficacy of Ang I-converting enzyme inhibitor therapy in rodents. *J Clin Invest* 120(4): 1229–39.

- WEIR, M.R., ET DZAU, V.J. (1999) The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens* 12(12 Pt 3): 205S-13S.
- WELLE, M. (1997) Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 61(3): 233-45.
- WERNERSSON, S., ET PEJLER, G. (2014) Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* 14(7): 478-94.
- WILLIAMS, D.L., JONES, K.L., PETTIBONE, D.J., LIS, E.V., ET CLINESCHMIDT, B.V. (1991) Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 175(2): 556-61.
- WINTROUB, B.U., KAEMPFER, C.E., SCHECHTER, N.M., ET PROUD, D. (1986) A human lung mast cell chymotrypsin-like enzyme. Identification and partial characterization. *J Clin Invest* 77(1): 196-201.
- WRIGHT, J.W., KREBS, L.T., STOBBS, J.W., ET HARDING, J.W. (1995) The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol* 16(1): 23-52.
- XING, W., AUSTEN, K.F., GURISH, M.F., ET JONES, T.G. (2011) Protease phenotype of constitutive connective tissue and of induced mucosal mast cells in mice is regulated by the tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(34): 14210-15.
- XU, D., EMOTO, N., GIAID, A., SLAUGHTER, C., KAW, S., DEWIT, D., ET YANAGISAWA, M. (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78(3): 473-85.
- XU, J., SUN, Y., CARRETERO, O.A., ZHU, L., HARDING, P., SHESELY, E.G., DAI, X., RHALEB, N.-E., PETERSON, E., ET YANG, X.-P. (2014) Effects of cardiac overexpression of the angiotensin II type 2 receptor on remodeling and dysfunction in mice post-myocardial infarction. *Hypertension* 63(6): 1251-9.
- YAMAMURA, H., NABE, T., KOHNO, S., ET OHATA, K. (1994) Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. *Eur J Pharmacol* 265(1-2): 9-15.
- YAMASHITA, N., AKIMOTO, Y., MINOGUCHI, K., SEKINE, K., NAKAJIMA, M., OKANO, Y., OHTA, K., ET SAKANE, T. (1999) Inhibitory effects of pemirolast potassium and FK506 on degranulation and IL-8 production of eosinophils. *Allergol Int* 48(1): 37-42.
- YANAGISAWA, H., HAMMER, R.E., RICHARDSON, J.A., EMOTO, N., WILLIAMS, S.C., TAKEDA, S. I., CLOUTHIER, D.E., ET YANAGISAWA, M. (2000) Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest* 105(10): 1373-82.

- YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K., ET MASAKI, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332(6163): 411–5.
- YECIES, L.D., WEDNER, H.J., JOHNSON, S.M., JAKSCHIK, B.A., ET PARKER, C.W. (1979) Slow reacting substance (SRS) from ionophore A23187-stimulated peritoneal mast cells of the normal rat. I. Conditions of generation and initial characterization. *J Immunol* 122(5): 2083–9.
- ZUO, Y., PERKINS, N.M., TRACEY, D.J., ET GECZY, C.L. (2003) Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain* 105(3): 467–79.